SYNTHESEWEGE ZU ENKEPHALIN UND ENKEPHALINDERIVATEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hans Horn
aus Unterdigisheim

1981

c 1 981

SYNTHESEWEGE ZU ENKEPHALIN UND ENKEPHALINDERIVATEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Hans Horn
aus Unterdigisheim

1981

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juli 1981

Dekan:	Prof. Dr. Ernst Reinhard
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Voelter
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Ernst Bayer

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Abstract

H o r n , Hans

Synthesewege zu Enkephalinen und Enkephalinderivaten

Nach klassischen Synthesewegen werden die Sequenzen von Leucin- und Methionin-Enkephalin sowie der drei Analoga, $[\beta\text{-Ala}]^2$ Leucin-, $[\beta\text{-Ala}]^2$-Methionin- und $[\text{Tyr(OMe)}]^1$-Leucin-Enkephalin hergestellt. Dazu werden mehrere Synthesevorschläge erarbeitet und auch experimentell nachvollzogen, um somit eine Optimierung bezüglich Ausbeute, Reinigung und Synthesedauer zu bekommen. Die Produkte zeigen mit Hybridzellen des Typs Neuroblastoma X Glia biologische Aktivität. Von den in der Arbeit vorgeschlagenen Synthesestrategien führt der Aufbau nach Schema 6 unter den genannten Aspekten zu den besten Ergebnissen. Das Molekül wird, beginnend am C-terminalen Ende, aus den 2 Dipeptideinheiten L-Phe-L-Leu-OH (Met-OH) und Gly-Gly-OH und dem Aminosäurederivat Boc-L-Tyr-OH aufgebaut. Als Aminoschutzgruppe wird der tert.-Butylocycarbonylrest verwendet und gekuppelt wird ausschließlich über Hydroxysuccinimidaktivester. Die Schutzgruppe wird mit 5 N Salzsäure in Dioxan abgespalten. Ein hochreines Produkt erhält man durch Gel-Filtration an Sephadex G 10.

Für meine Eltern und Maria

Die vorliegende Arbeit wurde mit Unterbrechungen in der Zeit von Januar 1976 bis Dezember 1980 am Lehrstuhl für organische Chemie I,Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen,Direktor Professor Dr.E.Bayer,unter wissenschaftlicher Anleitung von Professor Dr.W.Voelter angefertigt.

Herrn Professor Dr.W.Voelter
danke ich herzlich für die Themenstellung,sein stetes Interesse und großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.
Herrn Professor Dr.E.Bayer
danke ich für die bereitwillige Überlassung von Institutseinrichtungen.
Dem Verband der chemischen Industrie sei für die Verleihung eines Promotionsstipendium herzlich gedankt.

Folgenden Damen und Herren bin ich zu Dank verpflichtet:

Für die Aufnahme zahlreicher Spektren möchte ich Herrn Bartholomä (MS,FD-MS), Herrn Dipl.Chem.W.Fuchs (^{13}C-NMR) danken. Frau Munari, Fräulein Naumann und Frau Öhling sei für die Durchführung der Aminosäurenanalysen und Herrn Wurmstich und Fräulein Seifried für die Durchführung der Elementaranalysen gedankt. Herrn Thomas Härtner und Fräulein Gabi Schacht danke ich sehr für die sorgfältige Durchführung präparativer Arbeiten im Labor. Besonderen Dank schulde ich Frau Hella Schmid für die Anfertigung des Manuskripts.

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Allgemeiner Teil	2
1.	Isolierung der Enkephaline	2
2.	Konformation der Enkephaline	5
3.	Biochemische Bildung	8
4.	Opiatwirkung der Enkephaline	10
5.	Metabolismus der Enkephaline	12
6.	Struktur-Aktivitätsbeziehung	13
7.	Wirkungsmechanismus	16
III.	Themenstellung	19
IV.	Spezieller Teil	20
1.	Vorüberlegung zur Synthese	20
2.	Synthesen des Methionin- und Leucin-Enkephalins	22
a.	Syntheseschema 1	22
b.	Syntheseschema 2	27
c.	Syntheseschema 3	30
d.	Syntheseschema 4	36
e.	Syntheseschema 5	37
f.	Syntheseschema 6	42
g.	Syntheseschema 7	44
3.	Synthesen der Enkephalinderivate	47
a.	Syntheseschema 8	47
b.	Syntheseschema 9	51
c.	Syntheseschema 1o	54
d.	Syntheseschema 11	55

4.	Abspaltung der Schutzgruppen und chromatographische Reinigung der Enkephaline und Enkephalinderivate	57
5.	Bestimmung der biologischen Aktivität	61
V.	Experimenteller Teil	66
A.	Spektroskopische Methoden	66
B.	Chromatographische Methoden	67
C.	Sonstiges	68
D.	Chemikalien	69
E.	Arbeitsvorschriften	71
	Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 1	71
	Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 2	84
	Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 3	95
	Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 4	110
	Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 5	114
	Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 6	124
	Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 7	131
	Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 8	139

Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 9 145

Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 10 152

Synthesevorschriften der Verbindungen zum Syntheseschema 11 155

VI. Zusammenfassung 158

VII. Literaturverzeichnis 161

Folgende Abkürzungen werden verwendet:

Boc	=	tert.-Butyloxycarbonyl
Bzl	=	Benzylether
DCC	=	Dicyclohexylcarbodiimid
DMF	=	Dimethylformamid
EE	=	Essigester
EI	=	Elektronenstoßionisation
EtOH	=	Ethanol
FD-MS	=	Felddesorptions-Massenspektrometrie
HOBt	=	1-Hydroxybenzotriazol
HAc	=	Essigsäure
MeOH	=	Methanol
OMe	=	Methylester
PFT	=	Puls-Fourier-Transformation
Pht	=	Phthaloyl
OSu	=	N-Hydroxysuccinimidester
TEA	=	Triethylamin
TFA	=	Trifluoressigsäure
THF	=	Tetrahydrofuran
Z	=	Benzyloxycarbonyl

I. EINLEITUNG

Im Jahre 1806 isolierte der deutsche Apotheker Friedrich Sertürner aus dem eingetrockneten Milchsaft unreifer Samenkapseln des Schlafmohns (Papaver somniferum) ein Alkaloid in kristalliner Form. Er nannte die neue Substanz Morphin, nach Morpheus, dem griechischen Gott der Träume, da sie auf das Zentralnervensystem einschläfernde und euphorische Wirkung ausübt. Sie ist eine Hauptkomponente des aus über 20 verschiedenen Alkaloiden bestehenden Milchsaftes von Papaver somniferum (Opium). Es dauerte aber noch über 100 Jahre bis Schöpf [1] die chemische Strukturformel richtig angeben konnte, die 1952 durch die Totalsynthese von Gates und Tschudi [2] bestätigt wurde.

Das Morphin fand als starkes Analgetikum zur Schmerzlinderung in der Medizin sehr rasch Verwendung. Leider ist aber eine längere Applikation des Schmerzmittels nicht möglich, da es im Körper Gewöhnung und Sucht hervorruft. Es war und ist daher immer noch Ziel der Pharma-Forschung, ein Schmerzmittel zu finden, das die gleiche Wirkung wie Morphin zeigt, aber nicht süchtig macht.

Die Tatsache, daß weitere Opium-Alkaloide, wie etwa Codein, Narcotin oder andere synthetisch hergestellte Morphinderivate im menschlichen Körper eine mehr oder weniger starke Wirkung zeigen, läßt vermuten, daß es im Zentralnervensystem (ZNS) Rezeptoren geben muß, die stereospezifisch mit den genannten Opiaten in Wechselwirkung treten können und somit die beobachtete Wirkung hervorrufen[3].

Die Existenz solcher Opiatrezeptoren konnte tatsächlich nachgewiesen werden [4-8]. Die Anwesenheit dieser spezifischen Bindungsstellen führte zu dem Schluß, daß es im Körper eigene Substanzen geben müsse, die mit diesen Rezeptoren reagieren [8-9]. Solche "endogene Opiate", wie man sie heute nennt, wurden tatsächlich gefunden [10-13].

Im Jahre 1975 isolierten Hughes und Kosterlitz [14] aus dem Gehirn von Schweinen eine Substanz, die in biologischen Testreihen morphin-ähnliche Wirkung zeigt. Dadurch war die Existenz von körpereigenen Opiaten, die schon zehn Jahre vorher postuliert worden ist, experimentell bewiesen. Kurze Zeit später fand man auch endogene Opiate im menschlichen Gehirn und Zentralnervensystem [15]. Es scheint daher gesichert zu sein, daß die Schmerzempfindung im Körper der Wirbeltiere über diese körpereigenen Opiate gesteuert wird.

II. ALLGEMEINER TEIL

1. Isolierung

Wie bereits erwähnt, isolierten 1975 Hughes und Kosterlitz [14,16] aus Schweinehirnextrakten ein Substanzgemisch, das unter verschiedenen Versuchsbedingungen morphinähnliche Wirkung zeigt. Die chromatographische Reinigung lieferte zwei Pentapeptide mit den Sequenzen L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH und L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH, die durch Edman Abbau und Massenspektrometrie bestätigt wurden. Diese Sequenzen wurden durch Synthesen endgültig ge-

sichert. Nach ihrem Vorkommen bezeichnete man die Peptide als Enkephaline ("im Gehirn") und zwar je nach der C-terminalen Aminosäure als Methionin- bzw. Leucin-Enkephalin. Bemerkenswert ist, daß die beiden Substanzen nicht in gleichen Mengenverhältnissen gefunden werden. So fanden Hughes und seine Mitarbeiter beim Schwein dreimal so viel Methionin-Enkephalin wie Leucin-Enkephalin. Snyder et al.[17-19] isolierten aus Gehirnextrakten von Rindern die gleichen Peptide. Allerdings fanden sie umgekehrte Mengenverhältnisse von Methionin-Enkephalin zu Leucin-Enkephalin, nämlich 1 : 3. Ein Grund für die von Tierart zu Tierart wechselnden Konzentrationsverhältnisse ist bis jetzt noch nicht bekannt.

Die größten Enkephalinkonzentrationen findet man im Gehirn; innerhalb desselben variieren sie aber je nach Region stark. So ist im limbischen System, das für die Stimmung und den Gemütszustand des Menschen verantwortlich ist, rund die zehnfache Menge an Met-Enkephalin vorhanden im Vergleich zum Cortex.während das Cerebellum nur Spuren davon aufweist (Tabelle 1) [20]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit denen von Kobayashi et al. [21], die quantitative Bestimmungen der Enkephalinkonzentrationen im Gehirn mittels Radioimmunoassays durchführten.

Wie zu erwarten ist, sind die Gehirnregionen mit den höchsten Enkephalinkonzentrationen identisch mit denen größter Opiatrezeptorendichte.

Tabelle 1: Gehalt an Enkephalinen in verschiedenen Gehirnregionen beim Meerschweinchen

Gehirnregionen	Met-Enkephalin	Leu-Enkephalin	Verhältnis
Cerebellum	10	-	-
Cortex	38 ± 5	28.5 ± 3	1.3
Hippocampus	86 ± 6	39 ± 5	2.2
Striatum	430 ± 24	100 ± 14	4.3
Thalamus	90 ± 7	11.7 ± 2.5	7.7
Pons/Medulla	80 ± 7	11.2 ± 1.5	7.1
Hypothalamus	260 ± 30	30 ± 10	8.6

Da die neu entdeckten Enkephaline im Körper die Funktion haben, Schmerzen zu unterdrücken oder zu verringern, findet man sie in den Regionen, die an der Schmerzempfindung und Schmerzweiterleitung beteiligt sind, wie z.B, im Rückenmark [22]. Um so überraschender war es, als man auch endogene Opiate im Dünndarm und dem Plexus myentericus von Meerschweinchen, Ratten und Mäusen fand [20]. Vermutlich haben sie hier nicht die Funktion eines Analgeticums (Tabelle 2).

Tabelle 2: Enkephalingehalt im Dünndarm verschiedener Tiere

	Total	Met-Enkephalin	Leu-Enkephalin
Kaninchen-Dünndarm	99.6 ± 7.8 (4)	-	-
Maus-Dünndarm	10.7 ± 1.3 (4)	-	-
Ratten-Dünndarm	18.5	-	-

Tabelle 2 (Fortsetzung)

		Total	Met-Enkephalin	Leu-Enkephalin
Meerschweinchen-Dünndarm	103	± 12 (4)	55.6 ± 5 (3)	25.3 ± 4 (3)
Meerschweinchen Plexus myentericus	408	± 50 (3)		
Meerschweinchen-Ringmuskulatur des Dünndarmes	66	± 10 (3)		

Gehalt in ng/g Gewebe

2. Konformation der Enkephaline

Im Normalfall sind die Opiatrezeptoren, die man über den ganzen Körper verteilt findet, mit den körpereigenen Opiaten, den Enkephalinen, besetzt. Überraschend ist, daß sie aber auch mit körperfremden Stoffen reagieren können, die chemisch gesehen zu einer ganz anderen Verbindungsklasse gehören. Bei Morphin und seinen Derivaten handelt es sich um Alkaloide, während die bis jetzt gefundenen Opiate durchweg Peptide sind. Daher müssen bestimmte Atomabstände der Morpin- und Enkephalinmoleküle gleich oder wenigstens ähnlich sein.

Morphin, es soll hier stellvertretend sein für die ganze Klasse der Alkaloide mit Opiateigenschaften, ist wegen des bicyclischen Systems und der Etherbrücke ein ziemlich starres Gebilde (Abb.1). Dagegen haben Peptidketten aufgrund ihrer einfacheren Bindungsverhältnisse eine viel größere Beweglichkeit. Wie aber mittels CD-Untersuchungen [23]

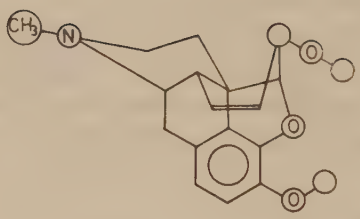


Abb.1: Struktur des Morphins

festgestellt werden konnte, sind die Enkephaline in wäßriger Lösung in ihrer Konformation teilweise festgelegt. Es liegt keine "random coil" Konformation vor, sondern bis zu einem bestimmten Grad eine geordnete Teilstruktur. Wie anhand von ^{13}C- und ^{1}H-NMR-Studien [24-36] gezeigt werden konnte, werden für die beiden Pentapeptide zwei mögliche Konformationen in wässriger Lösung angenommen. Zum einen wird eine dimere Form diskutiert, bei der zwei Enkephalinmoleküle in einer Art Kopf-Schwanzverknüpfung in Wechselwirkung treten (siehe Abb.2).

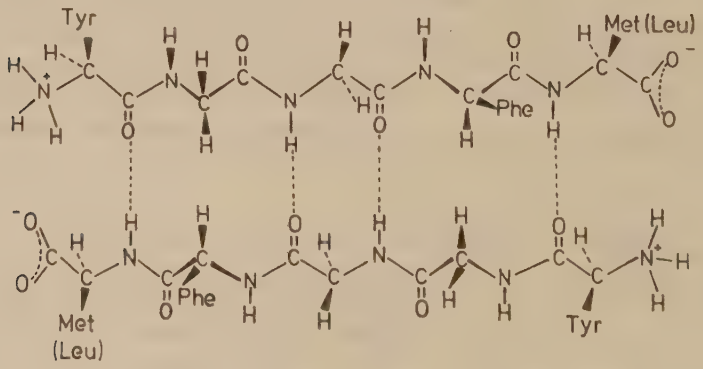


Abb.2: Kopf-Schwanzverknüpfung zweier Enkephalinmoleküle

Nach dem zweiten Strukturvorschlag soll das Molekül in einer Art ß-Helix vorliegen (Abb. 3). Dadurch ist die Möglichkeit gegeben, daß sich drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und zwar a) zwischen der Aminogruppe

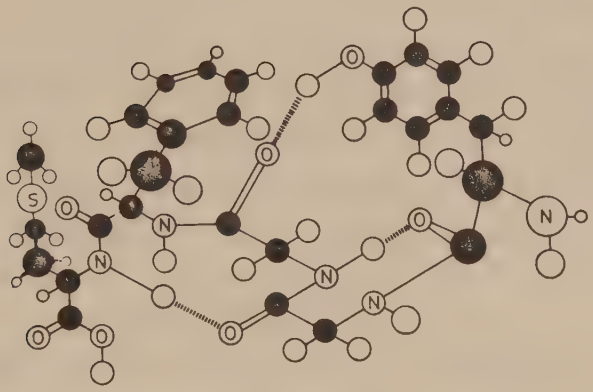


Abb. 3: ß-Helix von Enkephalin

von Met (5) und der C=O-Gruppe von Gly (2), b) der C=O-Gruppe von Gly (3) und der phenolischen OH-Gruppe von Tyr (1) und c) der Aminogruppe von Gly (3) und der C=O-Gruppe von Tyr (1). Im Fall a) bildet sich ein zehngliedriger und im Fall c) ein siebengliedriger Ring aus. Diese Wasserstoffbrückenbindungen schränken natürlich die Beweglichkeit des Moleküls stark ein. Der aromatische Ring des Tyrosins wird dadurch in eine definierte Lage gebracht. Abb.3 zeigt die Konformation des Moleküls mit den drei Wasserstoffbrückenbindungen.

3. Biochemische Entwicklung

Bereits zehn Jahre vor der Entdeckung der Enkephaline isolierten Li et al.[37-39] aus der Hypophyse von Schafen ein Peptid mit 91 Aminosäuren, das ß-Lipotropin, das beim Fettabbau eine gewisse Rolle spielt. Eine weitere Wirkung im Körper konnte aber bis jetzt nicht gefunden werden. Kurz nach der Entdeckung der Enkephaline im Jahre 1976 berichteten Li und Chung[40] über die Isolierung und Reinigung eines Peptids mit 31 Aminosäuren mit starker opiater Wirkung aus der Hypophyse des Kamels. Dasselbe Peptid fand man auch in Hypophysenextrakten von Schweinen, Schafen und Menschen[41-44]. Die Sequenzanalyse ergab, daß es sich bei diesem Peptid mit 31 Aminosäuren (ß-Endorphin) um die Teilsequenz mit den Aminosäureresten 60-91, des ß-Lipotropins handelt. Letzteres hat kaum Opiatwirkung. Aus Hypothalamus- und Hypophysengewebe konnten Guillemin et al.[45] zwei Peptide, eines mit16 und eines mit 17 Aminosäuren isolieren, die sie als α- und γ-Endorphin bezeichneten und die ebenfalls gewisse Opiatwirkung besitzen. Diese beiden Substanzen sind ebenfalls Bruchstücke des ß-Lipotropins und zwar entspricht das α-Endorphin dem ß-Lipotropin-[61-76] und das γ-Endorphin dem ß-Lipotropin-[61-77]. Die N-terminalen Enden dieser drei Endorphine sind mit der Sequenz des Met-Enkephalins identisch. Es lag daher auf der Hand, das ß-Lipotropin als eine Art "Pro"-Verbindung für die verschiedenen Endorphine und Enkephaline anzusehen[46]. Methionin-Enkephalin ist ß-Lipotropin-[61-65]. Dem Leucin-Enkephalin entspricht allerdings keine

natürliche Teilsequenz des Lipotropins.

Untersuchungen von Kobayashi [21] zeigten, daß sich die Enkephalinkonzentrationen im Gehirn von Ratten auch dann nicht ändern, wenn diesen die Hypophyse entfernt wird. Das in der Hypophyse gefundene ß-Lipotropin kann daher nicht als Prohormon für die Enkephaline angesehen werden. Die neueren Untersuchungen geben zu der Vermutung Anlaß, daß sich die Enkephaline aus größeren Endorphinen durch proteolytische Spaltung bilden und dann an ihren Wirkungsort transportiert werden. Die experimentellen Hinweise dafür liefern Goldstein und Mitarbeiter [47], indem sie aus Gehirnextrakten von Rindern und Ratten zwei Endorphine, die sich von den Enkephalinen deutlich unterscheiden, isolieren konnten. Das größere, bromcyanempfindliche Peptid ist dem aus der Hypophyse isolierten Endorphin ziemlich ähnlich und kann daher als Vorstufe des Methionin-Enkephalins angesehen werden. Das kleinere der beiden und gegen Bromcyan unempfindliche Peptid scheint ein Vorläufer des Leucin-Enkephalins zu sein. Die neuesten Forschungsergebnisse [48] über die biochemische Entstehung der Enkephaline widerlegen die Hypothese, daß das ß-Lipotropin als Prohormon fungiert. Udenfried und Mitarbeiter [49,50] isolierten aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks ein 4,7 K Peptid, das wahrscheinlich aus einem 50 K Peptid durch enzymatischen Abbau gebildet wird. Diese Autoren vermuten, daß das 50 K Peptid als Vorläufer des Leucin-Enkephalins und auch Methionin-Enkephalins angesehen

werden kann. Bei dem 4,7 K Peptid handelt es sich um ein Peptid, mit 39 Aminosäuren, dessen Primärstruktur 15-19 mit der Sequenz des Methionin-Enkephalins und 35-39 mit der des Leucin-Enkephalins identisch ist.

4. Opiatwirkung der Enkephaline

Die Untersuchungsergebnisse über die biologische Aktivität der Enkephaline, die von verschiedenen Arbeitsgruppen erhalten werden, sind ziemlich uneinheitlich. Das hängt einmal von der Art des Tests ab und zum anderen von den gewählten Versuchsbedingungen. Die Widersprüche, die bei Bindungsexperimenten gefunden werden, kommen hauptsächlich von den verschiedenen Inkubationstemperaturen. Übereinstimmend finden mehrere Arbeitsgruppen, daß Leucin-Enkephalin im Vas deferens der Maus eine größere Wirkung zeigt als Methionin-Enkephalin. Leucin-Enkephalin ist am Dünndarm des Meerschweinchens aber weniger stark wirksam. Genau dasselbe gilt für verschiedene Bindungsversuche. Scheinbar hat Leucin-Enkephalin eine kleinere Affinität zu den Opiatrezeptoren des Gehirns und der Hypophyse als Methionin-Enkephalin. Diese deutlichen Unterschiede weisen darauf hin, daß es ähnliche Rezeptoren im Zentralnervensystem und dem Plexus myentericus geben muß, die sich jedoch von denen im Vas deferens deutlich unterscheiden.

Es ist ziemlich wahrscheinlich, daß die Rezeptoren in allen drei Systemen ungleichmäßig verteilt sind. In einem bestimmten Bereich überwiegt jedoch ein Typ. Die Effekte der Opiate kann man daher unterteilen in den zentralen Effekt und den peripheren Effekt.

Zentrale Effekte

Die meisten spezifischen zentralen Effekte der Opiate, die von Naloxon antagonisiert werden können, werden genauso von den Enkephalinen hervorgerufen. Die schmerzmildernden Wirkungen, die von Leucin und Methionin-Enkephalin verursacht werden, sind jedoch ziemlich gering und von kurzer Dauer. So wird berichtet, daß Methionin-Enkephalin bis zu hundertmal weniger aktiv ist als Morphin und die Aktivität von Leucin-Enkephalin sogar noch niedriger liegt. Ebenso werden andere typische Opiateffekte im Zentralnervensystem nach Verabreichung der Enkephaline beobachtet, wie z.B. Sedation, geringere Empfindlichkeit beim tail flick test und erhöhte Temperatur. Methionin-Enkephalin erhöht wie Morphin die durch Dopa induzierte überempfindliche Verhaltensweise und sowohl Leucin-Enkephalin als auch Methionin-Enkephalin inhibieren die plötzliche Freisetzung von Acetylcholin im Cortex bei in vivo-Versuchen. Vermutlich treten die Enkephaline mit verschiedenen Neurotransmittersystemen in verschiedenen Zentren des Nervensystems, ähnlich wie die Opiate, in Wechselwirkung. Genauso wird eine Erhöhung der Wachstumshormonausschüttung und der Prolactinausschüttung bei Ratten durch Methionin-Enkephalin beobachtet. Die Enkephaline zeigen bei morphinsüchtigen Tieren die gleichen Symptome wie Morphin, nämlich Gewöhnung, Neigung zur Abhängigkeit und Sucht.

Periphere Effekte

Der präparierte Meerschweinchendünndarm und der Samenleiter

der Maus dienen als Testsysteme für Opiate, Endorphine und Enkephaline. Leucin-Enkephalin ist im Vergleich zu Methionin-Enkephalin im Samenleiter der Maus wirksamer, dagegen im Meerschweinchen-Ileum weniger aktiv. Ebenso wie Morphin verringert Methionin-Enkephalin die Acetylcholinausschüttung im Meerschweinchendünndarm und die Noradrenalinausschüttung im Vas deferens der Maus. Auch bei den isolierten Organen findet man Symptome von Gewöhnung. Über periphere Effekte beim lebenden Tier ist wenig bekannt. Cowan et al. [51] beobachten nach intravenöser Injektion von Enkephalinen bei Hunden ein Abfallen des diastolischen Blutdruckes.

5. Metabolismus der Enkephaline

Bei den Durchführungen der biologischen Tests stellt man fest, daß die Enkephaline im Vergleich zu den Endorphinen nach der Inkubation mit Gehirnextrakten sehr viel schneller ihre Aktivität verlieren. Die Halbwertszeit der Enkephaline beträgt bei in vivo- und in vitro-Experimenten etwa eine Minute, wohingegen die Endorphine ihre Aktivität auch nach mehreren Stunden noch besitzen. Es hat sich herausgestellt, daß unter der Wirkung einer Aminopeptidase freies Tyrosin abgespalten wird, was zu dem Aktivitätsverlust führt [52,53]. Dies wird durch die Synthese des Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Met-Derivates bestätigt. Dieses ist stabil gegenüber Peptidasen und im Gegensatz zu den Enkephalinen ein starkes Analgetikum, wenn es intraventrikulär appliziert wird [54,55]. Dagegen hat die Amidierung des Carboxylendes kaum einen Effekt auf die biologische Aktivität.

6. Struktur-Aktivitätsbeziehung

Um einen Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung zu finden, wurden eine ganze Reihe Enkephalinderivate synthetisiert, bei denen in der Sequenz eine Aminosäure durch eine andere ersetzt, das Molekül verlängert oder verkürzt wird [56-63]. Diese Studien sollten dazu dienen, die Hauptstrukturmerkmale der Enkephalinmoleküle aufzuklären, die für die Opiatwirkung wesentlich sind. Diese Derivate wurden sowohl im in vivo- als auch im in vitro-Versuch getestet. Eine Verkürzung des Moleküls um eine, zwei oder drei Aminosäuren vom Carboxylende her bewirkt beinahe einen totalen Aktivitätsverlust [58,64-66]. Dasselbe beobachtet man auch, wenn man das Molekül von beiden Seiten her abbaut. Einen totalen Aktivitätsverlust stellt man auch nach der Abspaltung des N-terminalen Tyrosins fest [18,58,67,68]. Die Abspaltung des Tyrosinrestes scheint sich auch beim raschen Abbau und der damit verbundenen Desaktivierung der Enkephaline im lebenden Organismus zu vollziehen. Genau so wirkt sich auch das Fehlen einer Aminosäure in der Sequenz aus. Auch der zusätzliche Einbau einer weiteren Aminosäure wie etwa beim Derivat H-L-Tyr-Gly-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH bringt eine Aktivitätsverminderung mit sich [58]. Büscher et al. [69] haben gezeigt, daß der Aminostickstoff des Tyrosins für die Wechselwirkung des Moleküls mit den Opiatrezeptoren unbedingt vorhanden sein muß. Morgan et al. [70] stellten fest, daß die N-Methylierung des Tyrosinstickstoffes eine Aktivitätssteigerung ver-

ursacht. Dies steht im Einklang mit Morphin, bei dem eine Entmethylierung des Stickstoffes mit einer Aktivitätsminderung einhergeht. Wie das O-Methylderivat Codein haben auch die [Tyr(OMe)]^1-Enkephaline nur geringe analgetische Wirkung [61]. Ersetzt man [Tyr]^1 durch andere aromatische Aminosäuren wie Phe, His oder Trp,oder durch aliphatische Aminosäuren wie Ala und Gly, so beobachtet man keine biologische Aktivität mehr[71]. Eine sehr große Aktivitätssteigerung erhält man beim Einbau eines D-Ala-Restes statt Glycin in Position zwei[61]. Dabei wird sowohl die biologische Aktivität als auch die Rezeptorbindung verstärkt. Dies kann einmal durch Stabilisierung der Peptid-Konformation im Rezeptor-Peptid Komplex und zum anderen durch die Stabilität der Tyr-D-Ala-Bindung gegenüber Aminopeptidasen verursacht werden.

Bei allen Derivaten, bei denen das Glycin in Position 3 durch eine andere Aminosäure ersetzt ist, beobachtet man eine Verringerung der Aktivität.

Die Synthesen und Tests der Enkephalinderivate mit veränderter Primärstruktur in Sequenzposition 4 führen zu dem Ergebnis, daß diese Molekülstelle von einer aromatischen hydrophoben Aminosäure mit L-Konfiguration eingenommen werden muß, damit biologische Wirksamkeit erzielt wird.

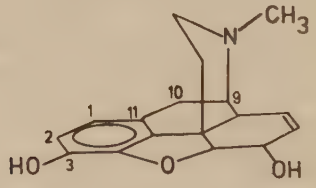
Die größten Veränderungen ohne totalen Aktivitätsverlust können in Position 5 des Enkephalins gemacht werden. Bei Oxydation des Methionins zum Sulfon bleibt die Aktivität bis zu 50% erhalten [64,71]. Auch die Anwesenheit der endständigen Carboxylgruppe ist nicht unbedingt erforderlich. Der Einbau einer D-Aminosäure in Position 5 bewirkt keine Aktivitätssteigerung. Dies deutet darauf hin, daß der enzymatische Abbau am Carboxylende die biologische Wirksamkeit wenig beeinflußt [59,71,72]. Die Aktivitätserhöhung bei Amidierung des C-terminalen Methionins oder Leucins wird durch größere Stabilität gegenüber Carboxypeptidasen erklärt.

Von den bis heute bekannten Derivaten besitzt L-Tyr-D-Ala-Gly-N(Me)-Phe-Met(O)-ol größere biologische Aktivität als Endorphine und Morphin. Selbst nach oraler Applikation tritt analgetische Wirkung auf und L-Tyr-D-Ala-Gly-N(Me)-Phe-Met(O)-ol bindet 30 mal stärker an die Opiatrezeptoren. Auf molarer Basis ist L-Tyr-D-Ala-Gly-N(Me)-Phe-Met(O)-ol nach intraventrikulärer Verabreichung 30 000, 1000 bzw. 23 mal aktiver als Methionin-Enkephalin, Morphin bzw. ß-Endorphin. Nach subkutaner Anwendung ist bei Mäusen und Ratten eine doppelte Aktivität im Vergleich zu Morphin festzustellen. Die biologische Aktivität reduziert sich bei oraler Verabreichung auf 1/5 (tail flick test) bzw. auf 1/3 (hot plate test). Dieses aktive Derivat zeigt bei Ratten nach mehrmaliger Anwendung auch die Symptome von Gewöhnung und Sucht.

7. Wirkungsmechanismus

Die Enkephaline fanden gleich nach ihrer Entdeckung grosses Interesse in Medizin und Biologie. Da sie vom Körper selbst produziert werden, glaubte man, ein Mittel zur Bekämpfung des Morphinismus gefunden zu haben. Man vermutete sogar, mit den Enkephalinen endlich ein schmerzstillendes Mittel zu besitzen, das keinerlei Gewöhnung und Sucht erzeugt. Diese Hoffnungen wurden aber nicht erfüllt; Enkephaline erzeugen, wenn auch nicht in dem Masse wie Morphin, Gewöhnung und Sucht.

Abbildung 4 zeigt eine Gegenüberstellung von Enkephalin und Morphin.



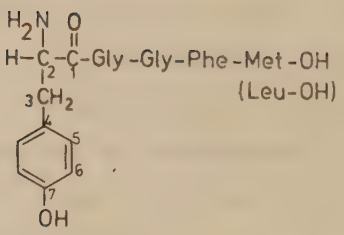


Abb. 4: Strukturformeln von Morphin und N-terminaler Aminosäure von Methionin-Enkephalin.

Die Ähnlichkeit zwischen dem Molekülrest C-3-2-1-11-10-9 des Morphins und dem des C-2-7 des Enkephalins ist auffallend. Auch die Röntgenstrukturanalyse bestätigt diese Übereinstimmung [73]. Diese beiden Molekülreste dürften als aktive Zentren bei der Reaktion der Opiate mit den Rezeptoren eine Rolle spielen.

Durch Aufarbeitung verschiedener subzellulärer Fraktionen aus Rattengehirnen findet man, daß die Enkephalinkonzentrationen in den Endigungen der Nervenzellen am größten sind. Deshalb werden sie als "Neurotransmitter" betrachtet, die bei der Schmerzempfindung eine Rolle spielen. Die enkephalinfreisetzenden Neuronen treten über Synapsen mit den excitatorischen Neuronen in Kontakt. Freigesetztes Enkephalin reagiert mit Opiatrezeptoren am Ende der excitatorischen Nerven, erhöht die Membrandurchlässigkeit für Natrium-Ionen. Dies verursacht eine Depolarisation im Axon dieser Nervenzelle. Durch die Einwirkung von Enkephalin wird die Nettodepolarisation verringert; dies hat eine verringerte Ausschüttung des excitatorischen Transmitters zur Folge (Abb. 5).

Wie die Effekte, die Morphin oder die endogenen Opiate an den Rezeptoren an der Zelloberfläche hervorrufen ins Zellinnere gelangen, ist bis ins Einzelne noch nicht geklärt. Es wird vermutet, daß bei diesem biochemischen Vorgang cyclische Nucleotide eine Rolle spielen. Collier und Roy [75] konnten zeigen, daß Morphin die durch Prostaglandin E_1 (PGE_1) stimulierte Adenylatcyclaseaktivität in Rattenhirnen hemmen kann. Opiate und Prostaglandin E_1 wirken

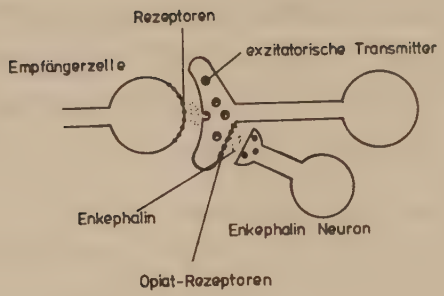


Abb.5: Wirkung der Opiate als Neurotransmitter.

als Antagonisten. Weiterhin wird festgestellt, daß bei Glia-Neuroblastoma-Hybridzellen (Tumorzellen, isoliert aus Nervengewebe) mit der Konzentrationsverminderung von cyclo-AMP eine Konzentrationserhöhung von cyclo-GMP einhergeht. Die biologische Bedeutung dieses Phänomens ist nich bekannt. Experimente von Klee und Nirenberg[76] mit Kulturen desselben Hybrids geben zu der Vermutung Anlaß, daß die Beeinflussung des cyclo-AMP-Spiegels in der Zelle durch die Opiate für Toleranz und Suchtwirkung dieser Stoffe teilweise verantwortlich ist. Ihre Vermutung soll durch folgendes Modell erklärt werden: Die Hemmung der Adenylatcyclase durch Opiate versucht die Zelle durch Mehrproduktion wettzumachen. Dadurch stellt sich eine cyclo-AMP-Konzentration ein, wie sie vor Verabreichung der Opiate vorhanden war. Nur durch höhere Dosen von Opiaten kann sie wieder gesenkt werden. Bricht man plötzlich die Zufuhr ab, so produziert die Zelle zu viel Adenylatcyclase und damit zuviel cyclo-AMP. Dieser er-

höhte AMP-Spiegel ist für einen Teil der Entziehungssymptome verantwortlich. Wenn dieses Modell richtig ist, scheint es fraglich zu sein, ob es überhaupt möglich ist, je einmal neue Schmerzmittel zu finden, die so wirksam sind wie Morphin, aber keine Toleranz und Sucht hervorrufen (siehe auch Abschnitt Bestimmung der biologischen Aktivität).

III. THEMENSTELLUNG

Mit der Entdeckung der Enkephaline wurden die Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Schmerzempfindung und der Schmerzunterdrückung stark intensiviert. Von diesen körpereigenen Analgetika erwartet man eine breite therapeutische Anwendung. So erhofft man sich von den Enkephalinen Erfolge bei der Behandlung Morphin- und Heroinsüchtiger. Auch wird vermutet, daß bei der Akkupunktur, die Schmerzunterdrückung auf einer Enkephalinausschüttung beruht. Weiterhin sollen Enkephaline auch bei Schizophrenie eine gewisse Rolle spielen.

Aufgrund der schwierigen und arbeitsintensiven Isolierung aus biologischem Material ist man auf synthetisch hergestellte Substanzen angewiesen. Die Synthese biologisch aktiver Peptide nach der Festphasensynthese führt häufig zu Rumpf- und Fehlsequenzen, die sehr schwer vom Hauptprodukt abzutrennen sind[77,78]. Auch die drastischen Abspaltungsbedingungen vom Harz führen nicht selten zu einer teilweisen Zerstörung des Moleküls. Die Enkephaline sollen daher ausschließlich nach den Methoden der klas-

sischen Peptidchemie hergestellt werden. Dabei werden verschiedene Wege eingeschlagen und somit eine Syntheseoptimierung bezüglich Ausbeute, Synthesedauer und auch Möglichkeit der Reinigung erarbeitet. Weiterhin sollen auch Derivate des natürlich vorkommenden Produktes synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität überprüft werden.

Die Zwischenverbindungen werden durch ^{13}C-NMR Messungen und Massenspektren charakterisiert.

Die biologische Aktivität wird mit Neuroblastoma X Glia-Zellen bestimmt.

IV. SPEZIELLER TEIL

1. Vorüberlegungen zur Synthese

Die biologische Aktivität einer wirksamen Verbindung ist von der optischen Reinheit abhängig. Daher sollen bei den einzelnen Synthesen möglichst nur solche Umsetzungen gemacht werden, die optisch einheitliche Produkte liefern. DCC/HOBt-[79,80], N-Hydroxysuccinimid-[81] und Azidkupplungen nach Honzl-Rudinger[82] genügen diesen Anforderungen. Die Esterverseifungen mit Alkalien verlaufen oft unter Racemisierung und Bildung von Nebenprodukten. Zudem werden die Verseifungszeiten bei längeren Peptidketten unverantwortbar lang.

In der vorliegenden Arbeit werden die α-Aminogruppen durch tert.-Butyloxycarbonyl(Boc)-, die Carbobenzoxy(Z)- und Phthaloylgruppen geschützt.

Die beiden ersteren sind Urethanderivate und daher sauer abspaltbar; dagegen kann der Phthaloyl-Rest mit Hydrazinhydrat in Methanol entfernt werden. Die hydrogenolytische Entfernung der Z-Gruppe gelang nur am Leucin Enkephalin. Ein Probeansatz des Methioninderivates lieferte keine zufriedenstellende Ergebnisse. Alle weiteren Synthesen wurden daher bei Gegenwart von Methionin so geplant, daß dieser Schritt umgangen werden konnte.

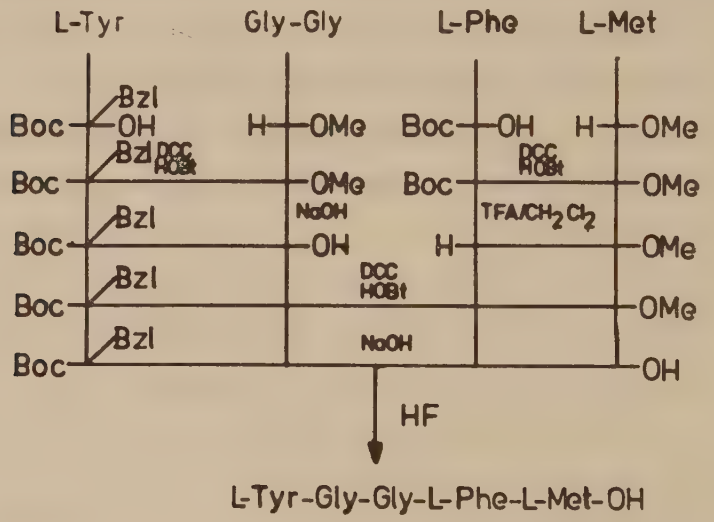
Ausbeuten, wie sie in der Literatur bei anderen schwefelhaltigen Peptiden gefunden wurden, konnten nicht bestätigt werden [83].

In der Enkephalinsequenz ist Tyrosin die einzige trifunktionelle Aminosäure und kann daher bei Kupplungsreaktionen zur Bildung von Nebenprodukten führen. Bei den ersten Synthesen wird die phenolische Hydroxygruppe mit dem Benzylrest als Benzylether geschützt. Bei der Deblockierung ergaben sich aber Probleme. Einmal ist die hydrogenolytische Entfernung aus den oben angegebenen Gründen nicht möglich, zum anderen verlief die acidolytische Abspaltung mit HCl/Eisessig weitgehend ohne Spaltung des Benzylethers. Die Abspaltung mit flüssigem Fluorwasserstoff lieferte die besten Ergebnisse. Da aber auch hierbei Nebenprodukte entstehen, wird bei den nachfolgenden Synthesestrategien Tyrosin mit ungeschützter Seitenkette eingesetzt.

2. Synthese des Methionin- und Leucin-Enkephalins

a) Syntheseschema 1.

Die erste Synthese des Methionin Enkephalins wurde nach dem unten angegebenen Schema durchgeführt.



Syntheseschema 1: Synthese von Methionin-Enkephalin

In einer DCC/HOBt-Kupplung wird Boc-Phe-OH mit dem Methylester des Methionins zum beidseitig geschützten Dipeptidderivat umgesetzt (Massenspektrum, siehe Abb.6, ^{13}C-Spektrum, Abb.7). Nach Entfernung der α-Aminoschutzgruppe mit Trifluoressigsäure in Methylenchlorid (^{13}C-Spektrum, Abb.8) wird mit dem Tripeptidderivat Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OH, das wiederum durch Verseifung aus Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe hergestellt wird (^{13}C-Spektrum, Abb.9), zum Pentapeptid Boc-Tyr(Bzl)-

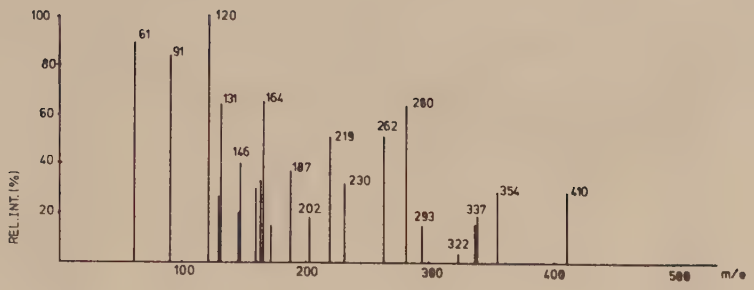


Abb.6: MS-Spektrum von Boc-Phe-Met-OMe. EI = 70 eV. Direkteinlass.

Interpretation der wichtigsten Fragment-Ionen

m/e	Fragmentionen
410	M^+
354	M-56 M -Isobutylen
336	M-74 M -tert.-Butanol
280	Phe-Met-OH
262	280-18
219	Boc-Phe^+ -COOH
164	Phe-NH_2^+
131	Met-OMe^+-Methanol
120	Phe^+ -COOH
91	Phe-CH_2^+
61	CH_3-S=CH_2^+

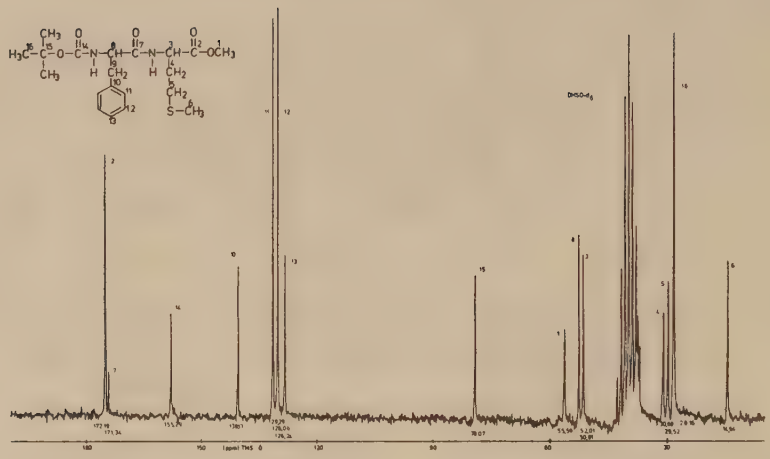


Abb.7: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Phe-Met-OMe; 250 mg, 2 ml DMSO-d_6, 31 200 Pulsinterferogramme, 22.628 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

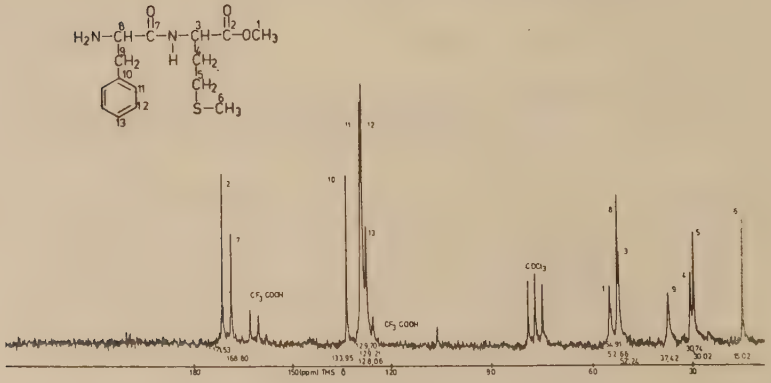


Abb.8: ^{13}C-NMR-Spektrum von Phe-Met-OMe.CF_3COOH; 250 mg 2 ml $CDCl_3$, 78 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

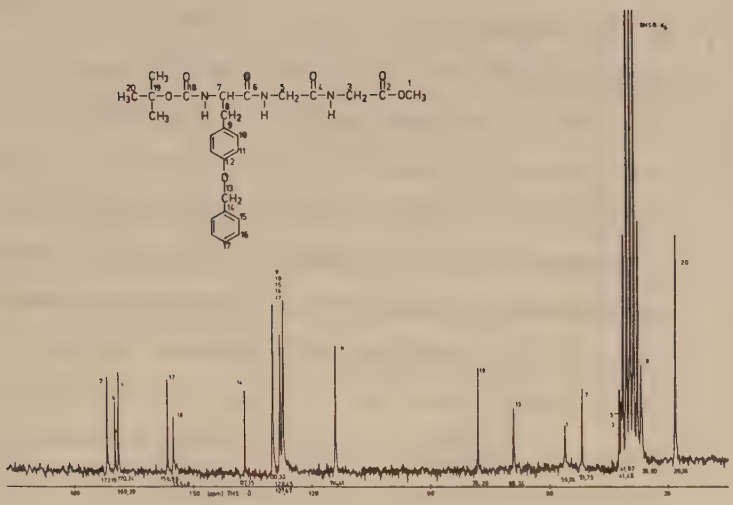


Abb. 9 : ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe; 250 mg, 2 ml DMSO-d_6, 68 000 Pulsinterferogramme, 22.628 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.

Gly-Gly-Phe-Met-OMe mit DCC/HOBt gekuppelt. Die anschliessende Verseifung des Pentapeptids bereitet aber unerwartete Schwierigkeiten. In mehreren Reaktionsansätzen wird einmal mit äquimolarer Menge an 1N Kalilauge in Methanol verseift und die Reaktion zeitlich verfolgt. Bereits nach einer Stunde kann im Dünnschichtchromatogramm nebem dem verseiften Produkt ein Nebenprodukt festgestellt werden, das sich bei längeren Reaktionszeiten vermehrt, obwohl sich die Ausgangsverbindung noch nicht vollständig umgesetzt hat. Durch die Benutzung von Dioxan und Dimethylformamid kann die Bildung des Nebenproduktes etwas zurückgedrängt werden. Auch der Versuch, die Hydrolyse bei pH 9 unter laufender Kontrolle des pH-

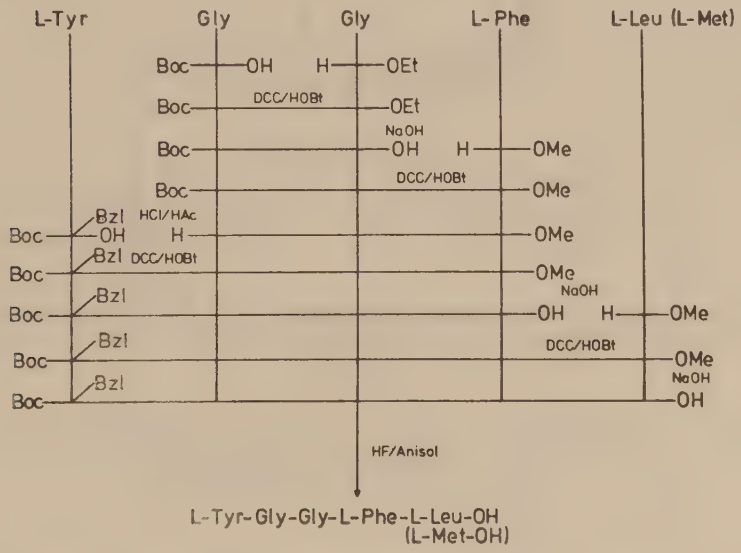
Wertes durchzuführen, führt nicht zum Erfolg. Die chromatographische Abtrennung des Beiproduktes auf einer LH 20 Säule mit Methanol als Elutionsmittel ist zwar prinzipiell möglich, die Ausbeuten an verseiftem Pentapeptid sind jedoch gering. Die beiden Produkte unterscheiden sich nur wenig in den Retentionszeiten und die Substanz wird teilweise mit dem Nebenprodukt eluiert. Der schnellste und bequemste Weg ist, die Verseifung nach knapp einer Stunde abzubrechen, das unumgesetzte Produkt durch mehrmaliges Ausschütteln mit Ether und Essigester zu extrahieren und die alkalische Lösung mit dem verseiften Produkt dann aufzuarbeiten. Dabei kommt man allerdings nicht über Ausbeuten von 50-60 %.

Die abschließende Schutzgruppenabspaltung vom α-Aminoende und der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosins war ebenfalls nicht ganz problemlos. Während die Boc-Gruppe nach dreißig Minuten mit HCl/Eisessig (1.2 N) oder einem Gemisch Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (1:1) vollständig abgespalten war, war die Benzylethergruppierung unter diesen Bedingungen noch etwa zur Hälfte erhalten geblieben (abgeschätzter Wert im DC). Die HF/Anisol-Acidolyse erfüllt zwar die erforderlichen drastischen Abspaltungsbedingungen, bildet aber trotz Zugabe von Anisol bei aromatischen Aminosäuren Nebenprodukte [64], die durch Gelchromatographie nur schwer abgetrennt werden können. Auch ist die präparative Durchführung ziemlich aufwendig; zudem führen geringste Spuren von Wasser zum Bruch

der Peptidbindungen und zu einer Zerstörung des Moleküls (Verlust von Tyrosin). Auf die gleiche Weise wurde das Leucin-Derivat hergestellt.

b) Syntheseschema 2.

Um beide Enkephaline möglichst nach einer Synthesestrategie herzustellen, wird folgender Weg eingeschlagen:



Syntheseschema 2: Herstellung von Leucin- und Methionin-Enkephalin

Es werden die gleichen Schutzgruppen wie bei der ersten Synthese verwendet. Ausgehend vom Dipeptidderivat Boc-Gly-Gly- (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 10) wird nach Kupp-

lung mit Phenylalaninmethylester (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 11) und anschließender Freisetzung der Aminogruppe mit Boc-Tyr(Bzl)-OH zum Tetrapeptid umgesetzt. Nach Verseifen desselben können nun entweder durch Ankuppeln von Leucin- oder Methioninmethylester die beiden Vorstufen hergestellt werden (^{13}-C-NMR-Spektrum Von Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OMe und Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-OMe, siehe Abbildung 12 und 13).

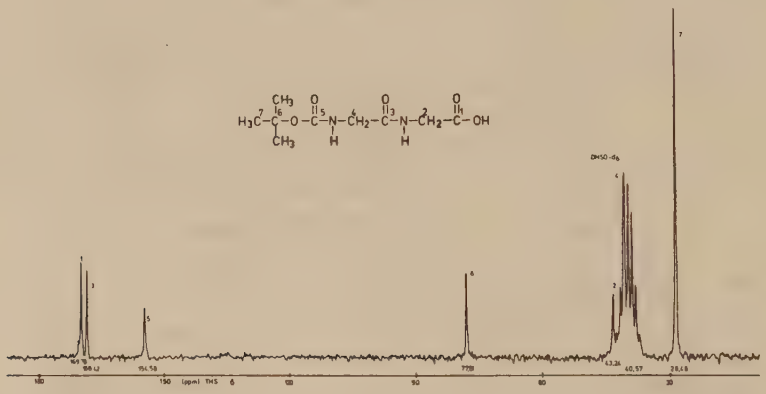
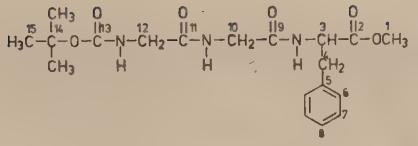


Abb.10: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Gly-Gly-OH; 200 mg, 1.5 ml DMSO-d_6, 46000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

Bei der Verseifung traten die bereits erwähnten Schwierigkeiten wieder auf, dabei lieferte das Leucinderivat bessere Ausbeuten, als die analogen Verbindung mit Methionin.

Diese beiden Synthesen sind aus bereits erwähnten Gründen verbesserungswürdig, daher wird die Strategie nach Syntheseschema 3 eingeschlagen.



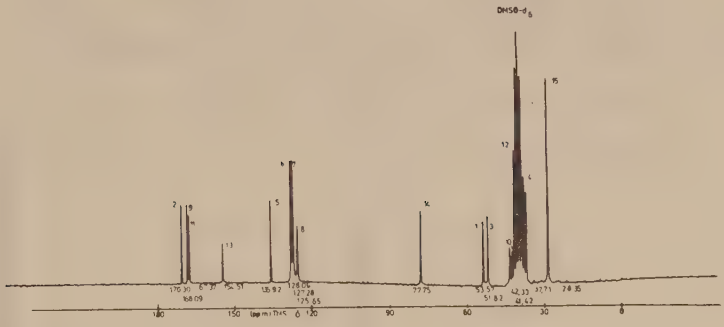


Abb.11: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Gly-Gly-Phe-OMe, 210 mg, 2 ml DMSO-d_6, 23 500 Pulsinterferogramme, 20 115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

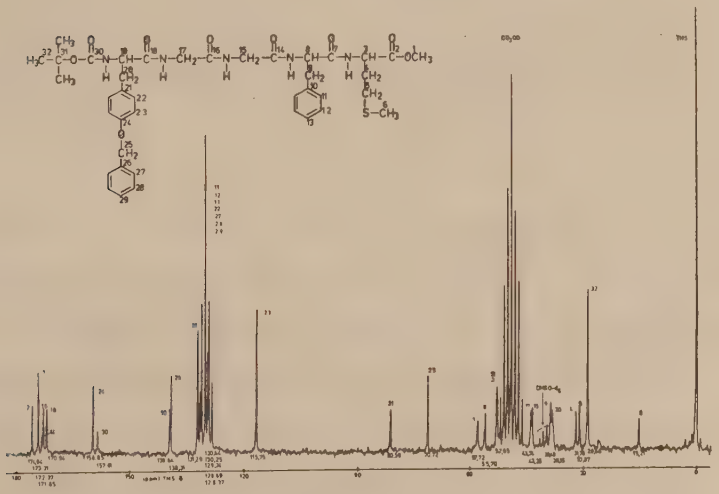


Abb.12: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Met-OMe, 210 mg, 2 ml CD_3OD, 95 500 Pulsinterferogramme, 20 115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

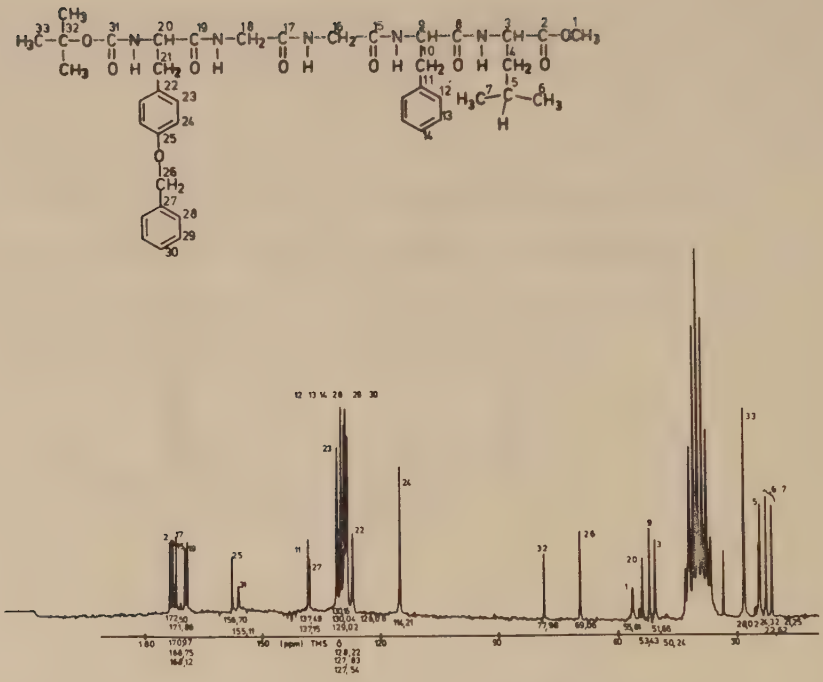
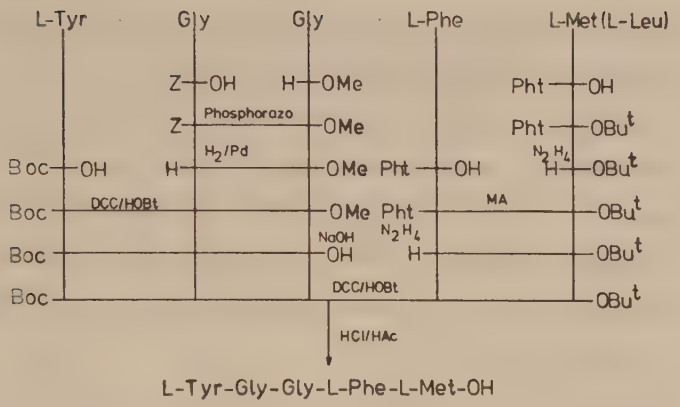


Abb.13: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-Phe-Leu-OMe, 160 mg, $^{12}CD_3OD$,66 700 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

c) Syntheseschema 3.

Die als problemlos erscheinende Kupplung von Glycinmethylester mit Boc-Gly-OH neigt bei der Methode mit Dicyclohexylcarbodiimid zur Bildung von erheblichen Mengen an Nebenprodukten, die alle schlecht abtrennbar sind. Wie die Untersuchungen polnischer Autoren zeigen [86], handelt es sich hauptsächlich um N-Acyl-



Syntheseschema 3: Herstellung von Leucin- und Methionin-Enkephalin

harnstoffderivate, die ein ähnliches Löseverhalten wie Boc-Gly-Gly-OH haben. Nach mehreren Synthesever-suchen bot sich die Phosphorazomethode als bester Weg an, um Glycylglycin zu erhalten.

Um die alkalische Esterverseifung bei der Deblockierung des Carboxylendes zu umgehen, wird der in letzter Zeit immer häufiger verwendete tert.-Butylester anstelle des Methylesters eingesetzt. Dieser ist unter milden acidoly-tischen Bedingungen abspaltbar. Mit seiner Verwendung kommt man so zu einem beidseitig geschützten Pentapep-tid, das nur noch sauer abspaltbare Gruppen enthält, die in einem Reaktionsschritt entfernt werden können.

Für die Herstellung der tert.-Butylester gibt es mehrere Verfahren. Die einfachste Art ist die Umsetzung der freien Aminosäure mit Isobutylen und konzentrierter Schwefelsäure als Katalysator in Dioxan als Lösungsmittel. Dabei hängt die Ausbeute von der Löslichkeit der betreffenden Aminosäure in dem Dioxan/Schwefelsäure-Gemisch ab. Die Löslichkeit von Methionin in dem Gemisch ist schlecht, sodaß diese einfache Methode nicht in Frage kommt.

Taschner [87] verwendet anstelle der freien Aminosäuren N-Acylderivate, die er dann mit tert.-Butanol unter Verwendung von Phosphoroxychlorid als Katalysator umsetzt. Die für diese Veresterung am häufigsten gewählte Carbobenzoxyschutzgruppe kann allerdings nicht verwendet werden, da eine hydrogenolytische Entfernung derselben nicht möglich ist (Methionin wirkt als Katalysatorgift). In dieser Arbeit wird dafür die basisch abspaltbare Phthaloylgruppe verwendet. Sie läßt sich relativ einfach (bei manchen Aminosäuren z.B. Methionin und Phenylalanin, durch Erhitzen von Phthalsäureanhydrid und Aminosäure auf 180-200°C!) einführen und mit Hydrazinhydrat wieder abspalten.

Das aus Phthalsäureanhydrid und Methionin hergestellte Phthaloylmethionin (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 14) wird mit tert.-Butanol zu Pht-Met-OBu^{t} (^{13}C-NMR-Spektrum siehe Abbildung 15) umgesetzt, danach wird mit Hydrazinhydrat die α-Aminoschutzgruppe abgespalten.

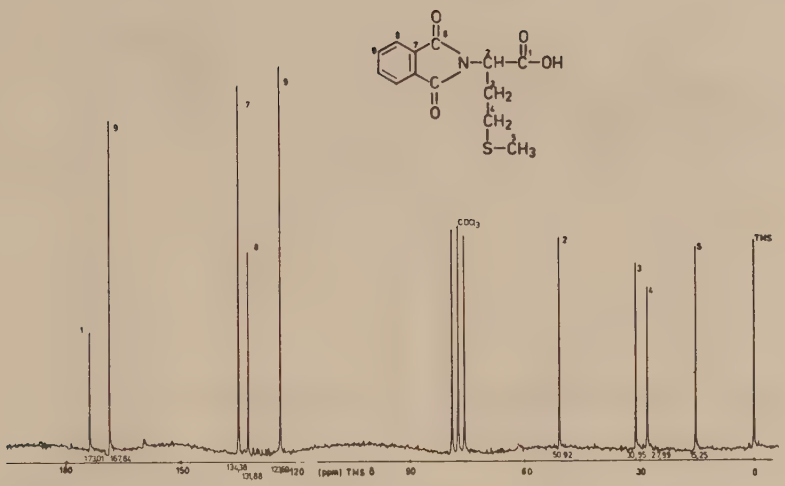


Abb.14: ^{13}C-NMR-Spektrum von Pht-Met-OH; 180 mg, 2 ml $CDCl_3$, 21000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

Die Kupplung mit Pht-Phe-OH unter Verwendung von DCC/HOBt liefert das Dipeptid Pht-Phe-Met-OBu^t (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 16).

Aus dem durch Phosphorazokupplung erhaltenen geschützten Dipeptid Gly-Gly-OMe wird die Z-Gruppe abhydriert und mit Boc-Tyr-OH (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 17) zum entsprechenden Tripeptid gekuppelt. Die Fragmentkondensation des Di- und Tripeptids mit Dicyclohexylcarbodiimid ergibt das Pentapeptid (FD-MS, siehe Abbildung 18). Die Schutzgruppen werden danach mit 1.2N HCl/Eisessig abgespalten. Genau nach dem gleichen Syntheseprinzip läßt sich Leucin-Enkephalin herstellen.

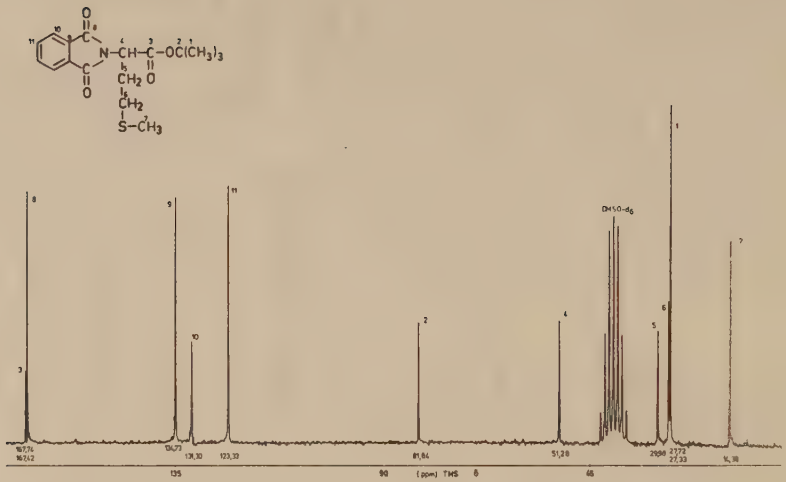


Abb.15: ^{13}C-NMR-Spektrum von Pht-Met-OBu^{t}; 190 mg, 2 ml DMSO-d_6, 23 500 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

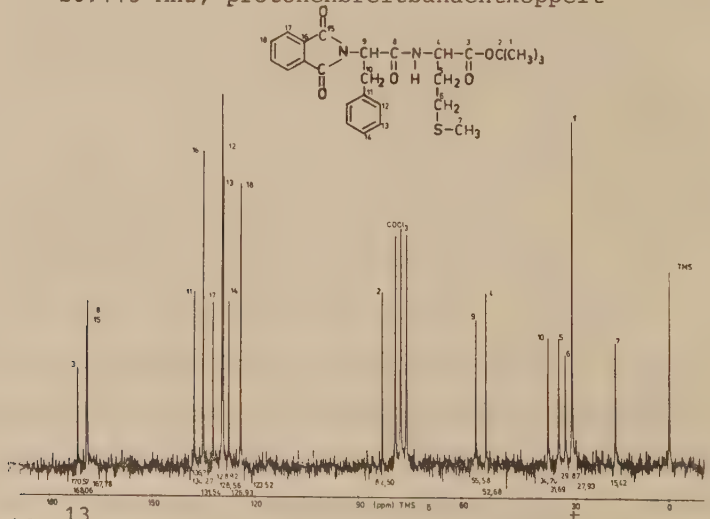


Abb.16: ^{13}C-NMR-Spektrum von Pht-Phe-Met-OBu^{t}; 180 mg, 2.5 ml $CDCl_3$, 17 900 Pulsinterferogramme, 22.628 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

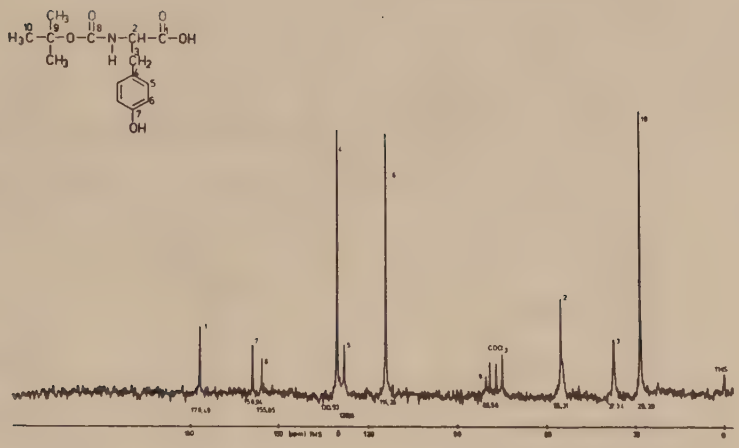


Abb.17: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr-OH, 210 mg, 2 ml DMSO-d_6, 8 700 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

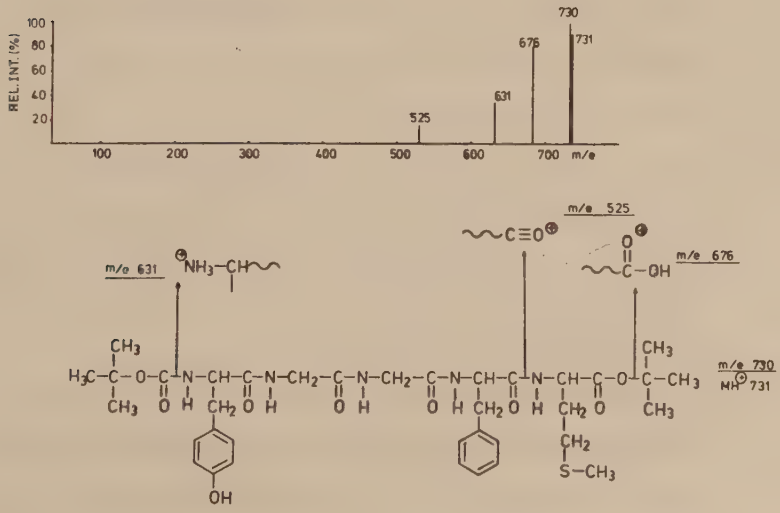
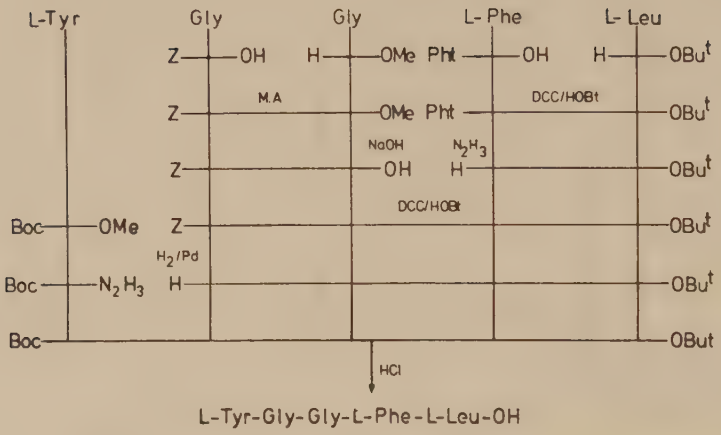


Abb.18: FD-MS von Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OBu^t, Emitterstrom 13 mA; Lösungsmittel Methanol

d) Syntheseschema 4



Syntheseschema 4: Herstellung von Leucin-Enkephalin

Syntheseschema 4 zeigt die Darstellung von Leucin-Enkephalin nach einem etwas modifizierten Wege. Als Carboxylschutzgruppe wird wiederum der tert.-Butylester verwendet. Im Gegensatz zu Schema 3 werden zwei Dipeptide zu einem Tetrapeptid gekuppelt, das dann nach Schutzgruppenabspaltung als Aminokomponente eingesetzt wird. (^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBu^t, siehe Abbildung 19).

Dieses Tetrapeptid wird mit Boc-L-Tyr-N_2H_3 durch eine Azidkupplung zum Pentapeptid (^{13}C-NMR-Spektrum und Massenspektrum, siehe Abbildungen 20 und 21) umgesetzt. Hier werden die Schutzgruppen mit konzentrierter Salzsäure abgespalten.

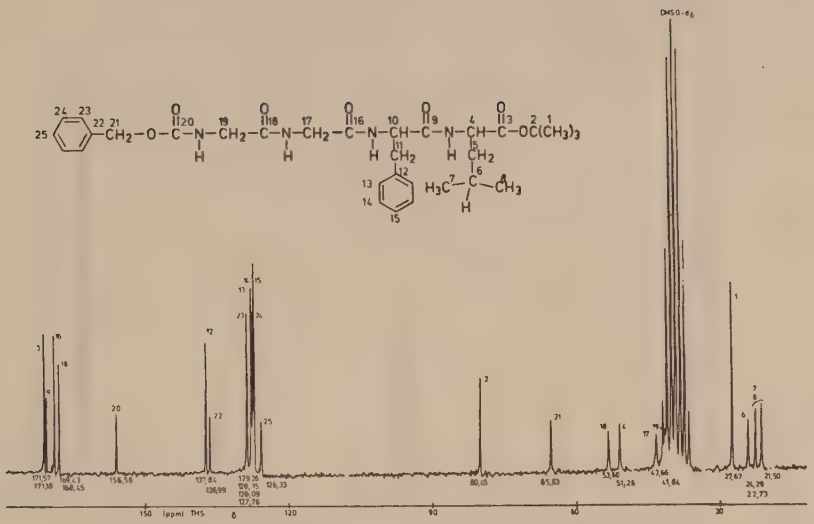


Abb.19: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-Gly-Gly-Phe-Leu-OBu^{t}; 230 mg, 2 ml DMSO-d$_6$, 63 000 Pulsinterferogramme, 22.628 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

e) Syntheseschema 5.

Nach Syntheseschema 5 werden Leucin- und Methionin-Enkephalin wiederum durch Aktivesterkupplungen und Fragmentkondensation "3 + 2" synthetisiert . Die C-terminalen Dipeptide L-Phe-L-Met-OH bzw. L-Phe-L-Leu-OH werden aus Boc-L-Phe-OSu und Methionin bzw. Leucin (^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Phe-Leu-OH, siehe Abbildung 22) hergestellt.

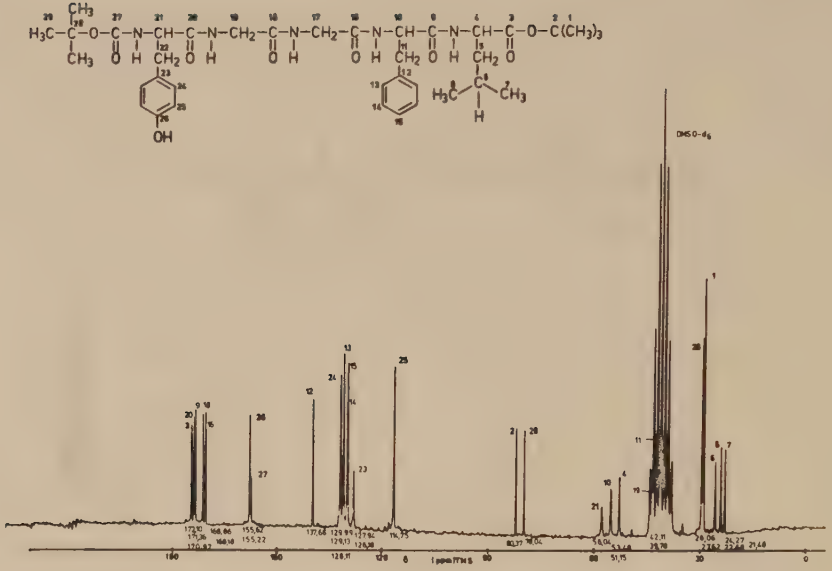


Abb.20: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OBu^t; 300 mg, 2 ml DMSO-d_6, 86 300 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

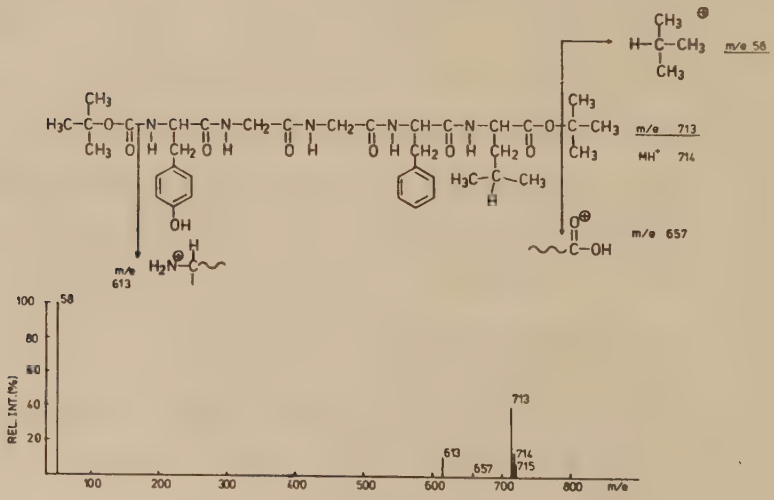


Abb.21: FD-MS-Spektrum von Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OBu^t, Emitterheizstrom 15 mA, Lösungsmittel Methanol

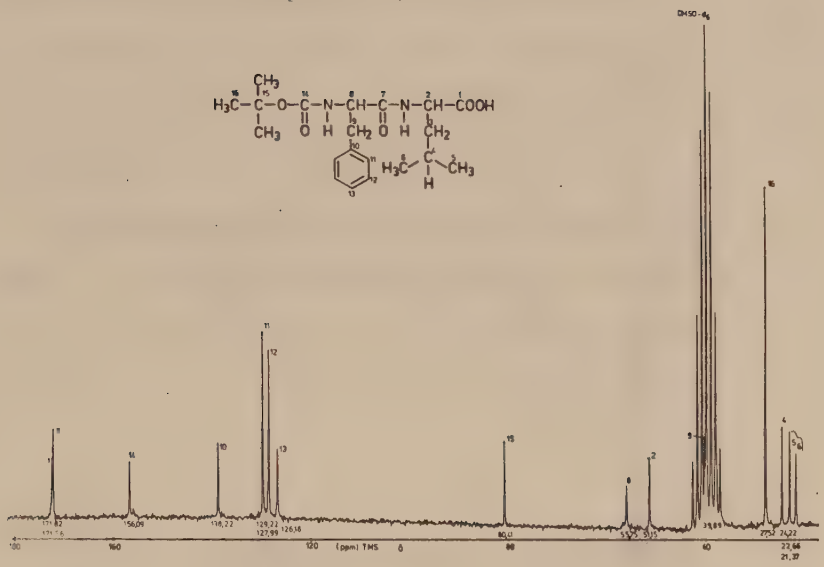
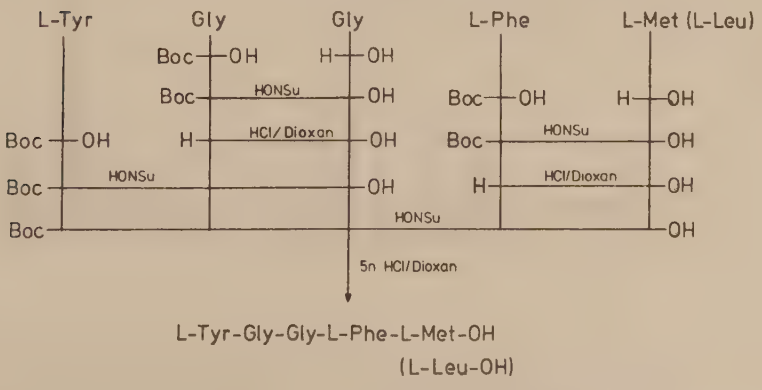


Abb.22: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Phe-Leu-OH; 210 mg, 2 ml DMSO-d_6, 35 500 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt



Syntheseschema 5: Synthesestrategie zur Darstellung von Leucin- und Methionin-Enkephalin

Diese Dipeptide werden nach Schutzgruppenabspaltung mit dem Tripeptid Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OH via Hydroxysuccinimid-Aktivester zu den Pentapeptiden Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH bzw. Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH umgesetzt. Dieses Tripeptid Boc-Tyr-Gly-Gly-OH wird seinerseits ebenfalls über eine Aktivesterkupplung aus Gly-Gly-OH und Boc-L-Tyr-OH hergestellt. ^{13}C-NMR-Spektren von Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH bzw. Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH, siehe Abbildungen 23 und 24).

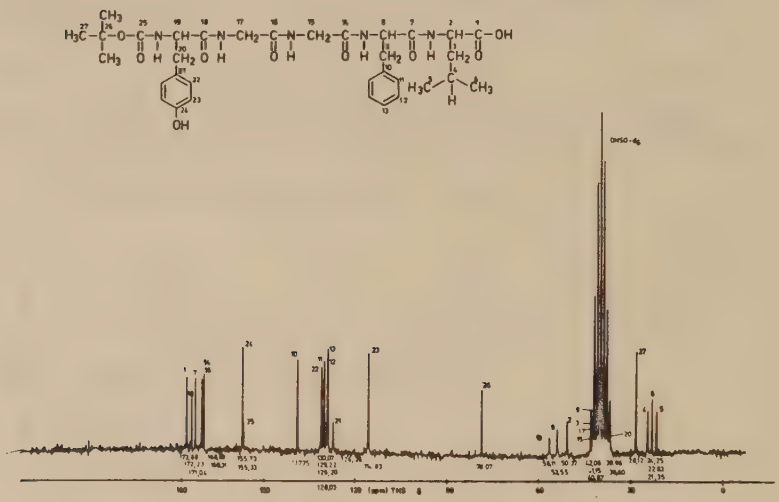


Abb.23: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH; 280 mg, 1.8 ml DMSO-d_6, 83 700 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

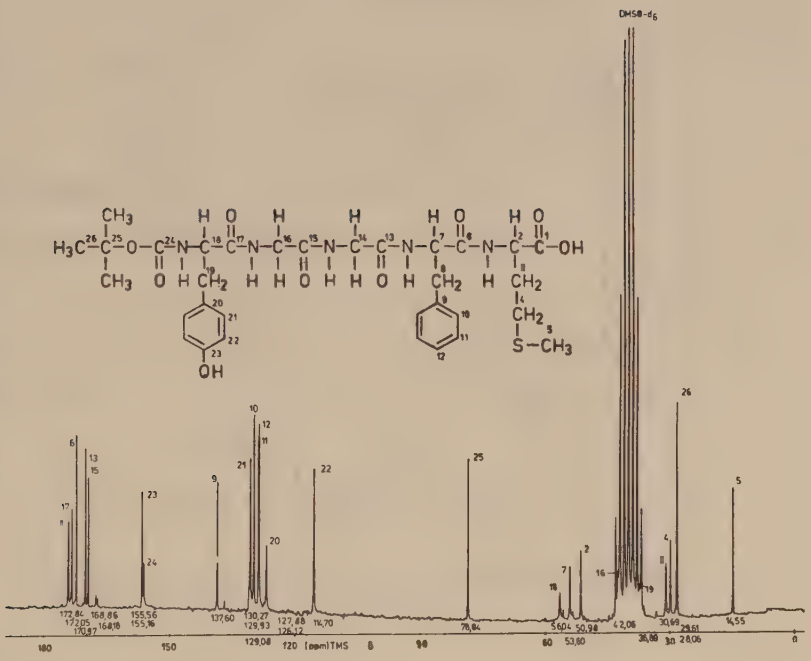
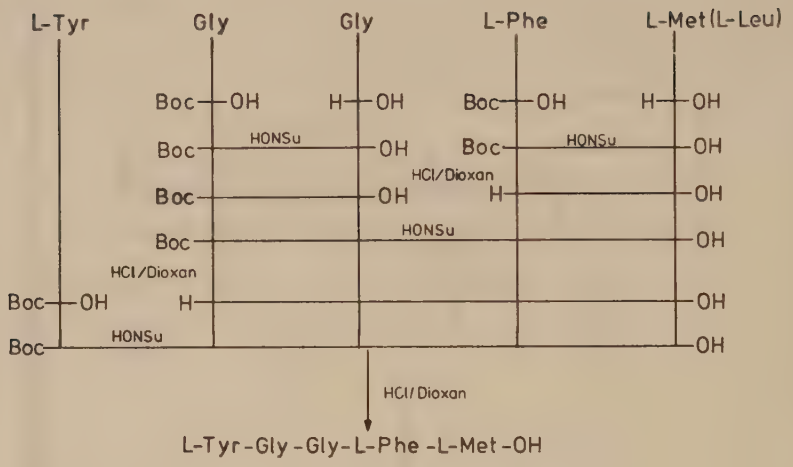


Abb.24: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH, 180 mg, 1.5 ml DMSO-d_6, 71 300 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

Aus beiden Pentapeptiden wird die Schutzgruppe mit 5 N HCl/Dioxan abgespalten.

f) Syntheseschema 6



Syntheseschema 6: Synthese von Methionin- und Leucin-Enkephalin

Auch in den Synthesen nach Schema 6 werden Leucin- und Methioninenkephalin über Aktivesterkupplungen mit N-Hydroxysuccinimid hergestellt. Man kuppelt 2 Dipeptide zum Tetrapeptid (Boc-Gly-Gly-OH + L-Phe-L-Met-OH bzw. L-Phe-L-Leu-OH zu Boc-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH bzw. Boc-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH). Aus den beiden Tetrapeptiden spaltet man die Schutzgruppen mit 5 N HCl/Dioxan ab und kuppelt dann mit Boc-L-Tyr-OSu (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 25) zu dem jeweiligen Pentapeptid. Schutzgruppenabspaltung mit HCl/Dioxan (5 N) ergibt Leucin- bzw. Methionin-Enkephalin (^{13}C-NMR-Spektren, siehe Abbildungen 26 und 27).

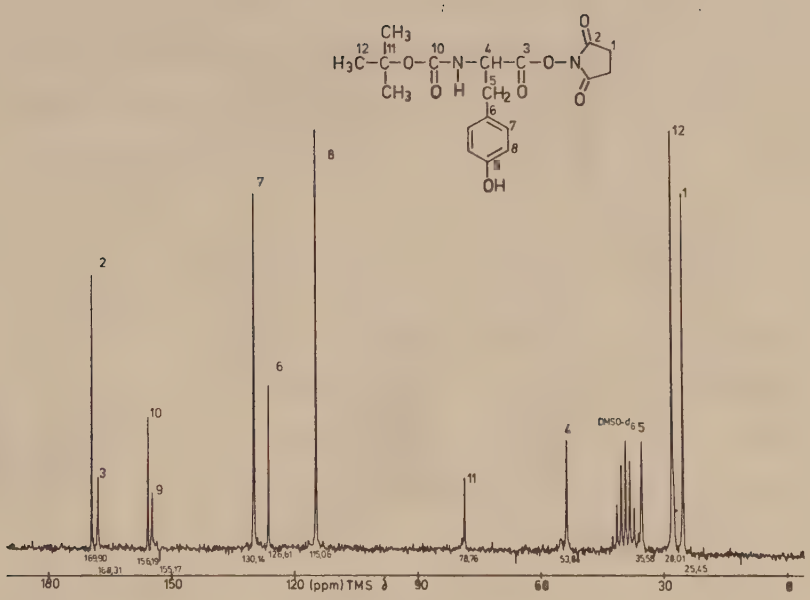


Abb.25: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Tyr-OSu; 200 mg, 2 ml DMSO-d_6, 32 000 Pulsinterferogramme, 20.15 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

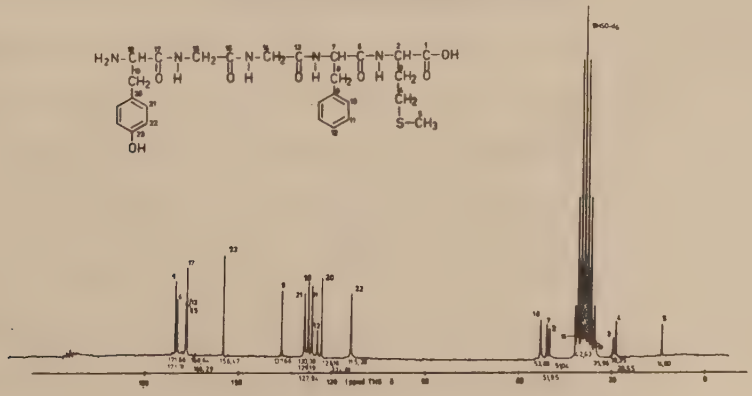


Abb.26: ^{13}C-NMR-Spektrum von Methionin-Enkephalin, 220 mg, 2 ml DMSO-d_6, 55200 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

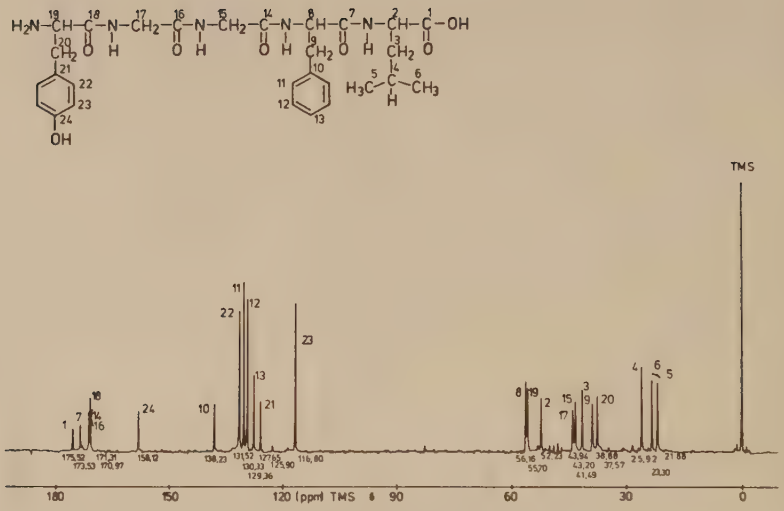
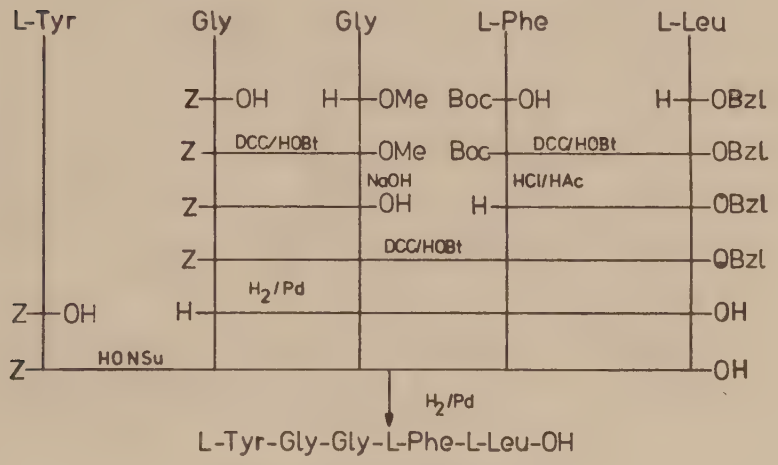


Abb. 27: ^{13}C-NMR-Spektrum von Leucin-Enkephalin; 240 mg, 2 ml $^{12}CD_3OD$, 108 600 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

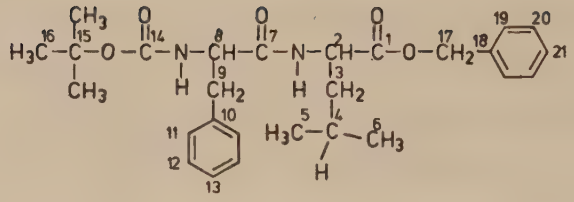
g) Syntheseschema 7.

Das Syntheseschema zeigt einen Weg zur Darstellung des Leucin-Enkephalins. Als Carboxylschutzgruppe wird der Benzylester verwendet. Die Kupplungen von Boc-L-Phe-OH mit L-Leu-OBzl mit DCC/HOBt ergibt das Dipeptid Boc-L-Phe-L-Leu-OBzl (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 28). Z-Gly-Gly-OH stellt man ebenfalls in einer DCC-Kupplung aus Z-Gly-OH und Gly-OMe und anschließender Verseifung her. Die hydrogenolytische Entfernung sowohl der Amino- als auch der Carboxylschutzgruppe liefert das freie Tetrapeptid Gly-Gly-Phe-Leu-OH

(^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 29), das dann mit dem Aktivester des Tyrosins Z-L-Tyr-OSu zum Pentapeptid umgesetzt wird. Die hydrogenolytische Entfernung des Benzyloxycarbonylrestes führt zum Leucin-Enkephalin.



Syntheseschema 7: Synthese von Leucin-Enkephalin



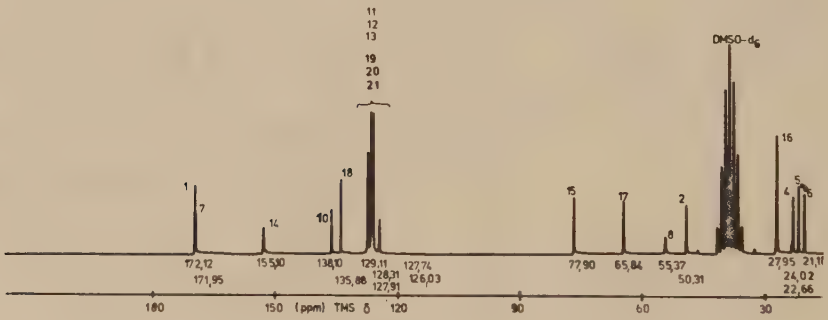
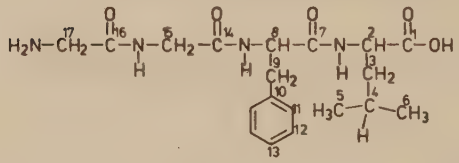


Abb.28: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-L-Phe-L-Leu-OBzl, 230 mg, 2 ml DMSO-d_6, 45 600 Pulsinterferogramme, 20.155 MHz, protonenbreitbandentkoppelt



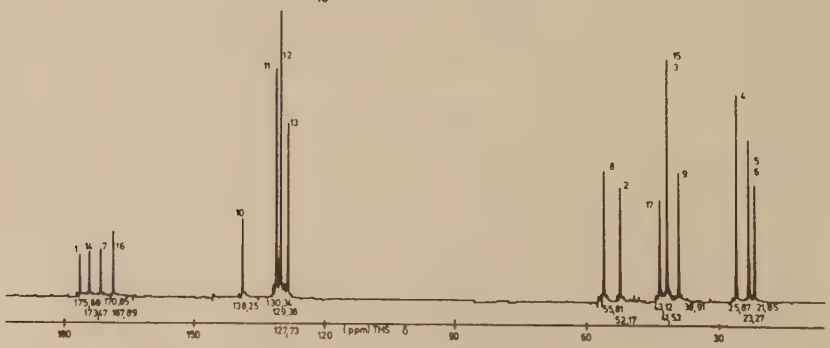
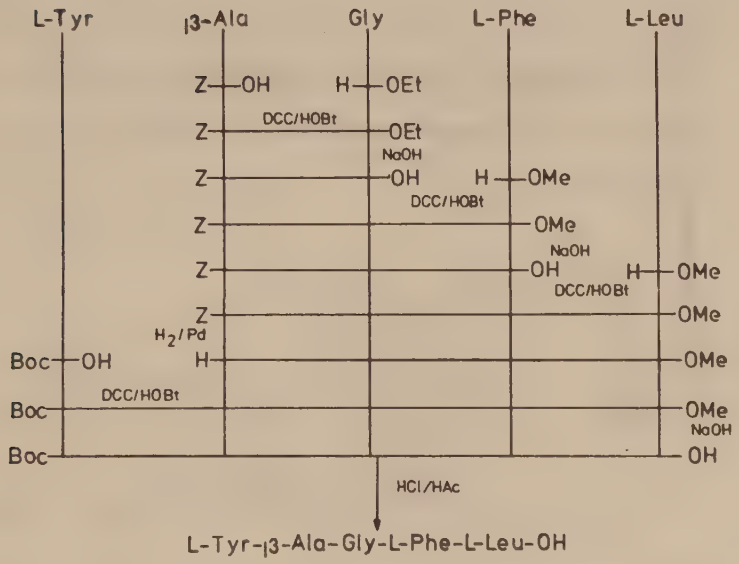


Abb.29: ^{13}C-NMR-Spektrum von Gly-Gly-Phe-Leu-OH; 190 mg, 2 ml $^{12}CD_3OD$, 66 300 Pulsinterferogramme, 22.628 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

3. Synthese der Enkephalinderivate

a) Syntheseschema 8.



Syntheseschema 8: Synthese von $[ß\text{-Ala}]^2$-Leucin-Enkephalin

Nach diesem Schema wird das $[ß\text{-Ala}]^2$-Leucin-Enkephalin synthetisiert. Dabei wird Z-ß-Ala mit Glycinethylester in einer DCC-Kupplung zum Dipeptidester umgesetzt; die anschließende Verseifung und Kupplung mit L-Phe-OMe ergibt das beidseitig geschützte Tripeptid Z-ß-Ala-Gly-L-Phe-OMe (MS, siehe Abbildung 30). Dieses wird wieder-

um mit Natronlauge verseift und dann mit dem Leucinmethylester zum Tetrapeptidester gekuppelt (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 31, MS, siehe Abbildung 32). Nach hydrogenolytischer Entfernung des Z-Restes erhält man ein Tetrapeptid, das als Aminokomponente mit Boc-L-Tyr-OH zum Pentapeptid Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe gekuppelt wird. Der Methylester wird alkalisch verseift und die Boc-Gruppe mit HCl/Eisessig sauer abgespalten.

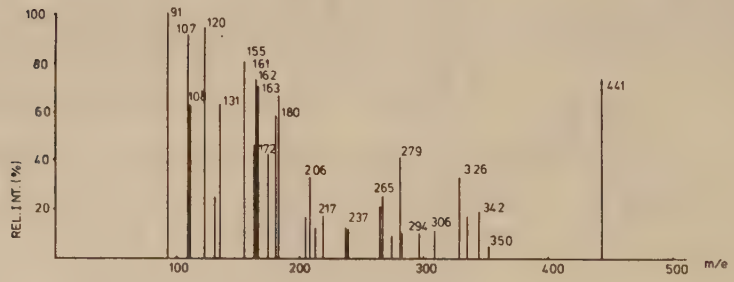


Abb.30: Massenspektrum von Z-ß-Ala-Gly-Phe-OMe, EI = 70 eV, Direkteinlaß

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen

m/e	Fragmentionen
441	M^+
350	M^+ - Ph-CH_2^+
279	M^+ - Phenylacrylsäuremethylester$^+$
206	M^+ - Gly-Phe-OMe
180	Phe-OMe^+ + H^+
155	O=C=N-CH_2-CH_2-CO-N-CH_2-C=O
120	NH_2=$CHCH_2$-Phe^+
107	Phe-CH_2-O^+
91	Phe-CH_2+

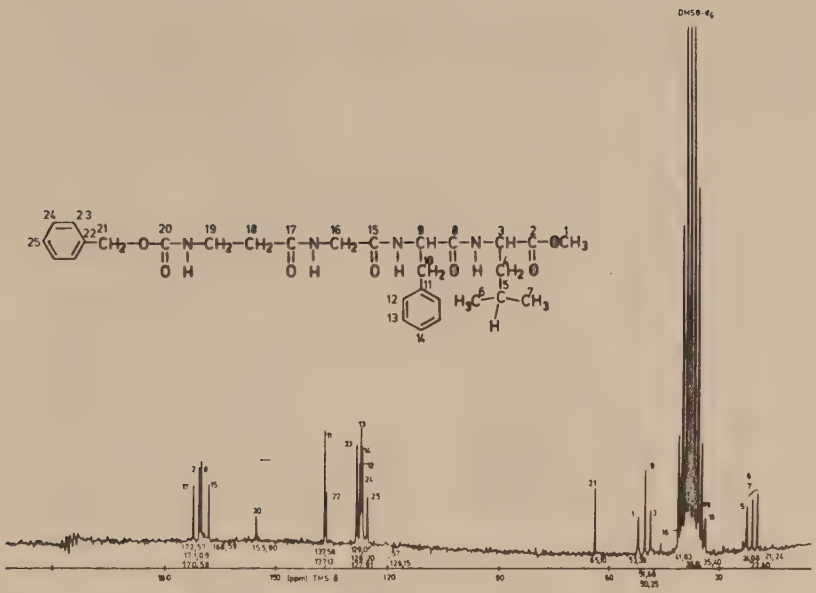
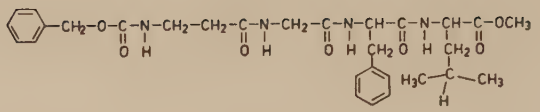


Abb.31: ^{13}C-NMR-Spektrum von Z-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe; 200 mg, 1.5 ml DMSO-d_6, 87 500 Pulsinterferogramme, 22.628 MHz, protonenbreitbandentkoppelt.



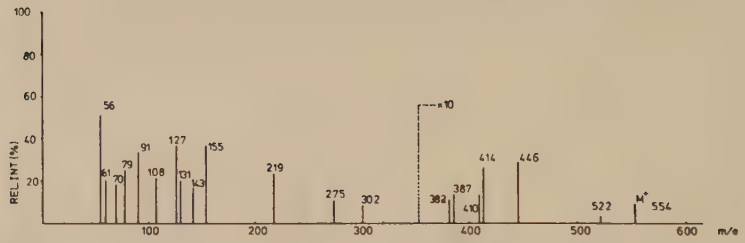
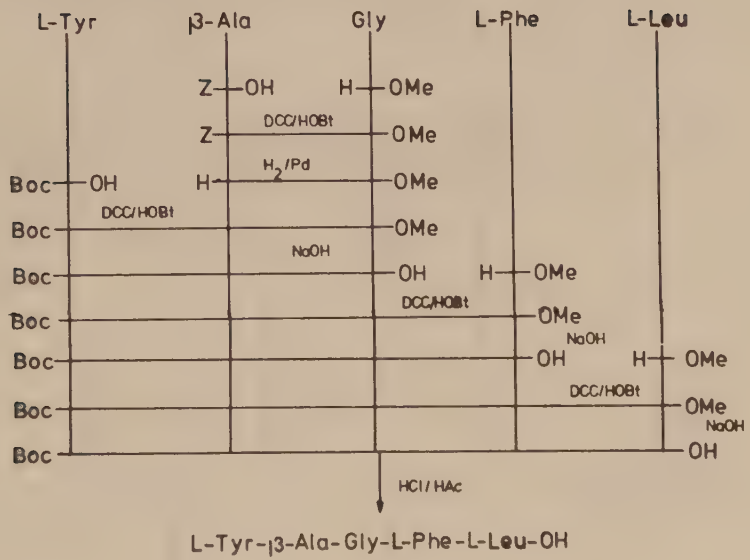


Abb.32: EI-Massenspektrum von Z-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe; EI = 70 eV, Direkteinlaß

Interpretation der wichtigsten Fragmentionen

m/e	Fragmentionen
554	M^+
522	M^+ - Methanol
446	M^+ - Benzylalkohol
410	M^+ - Leucin-Methylester
382	Z-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe^+ - OC-NH-Leu-OH
219	Phenylacrylsäure-Leu-OMe^+ - Isobutylen
155	$O=C=N-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-C=O^+$
127	Phenyl-CH_2-O-CO-NH-CH_2-CH_2-CO-NH-CH_2-CO^+ - Phe-CH_2-O-CO-
108	Phenyl-CH_2-O^+
91	Phenyl-CH_2^+
56	Isobutylen$^+$

b) Syntheseschema 9.



Syntheseschema 9: Synthese von [ß-Ala]^2-Leucin-Enkephalin

In dieser Synthesestrategie wird Z-ß-Ala-OH mit Glycinmethylester zum Dipeptid gekuppelt. Danach wird mit H_2 am Palladiumkontakt die Z-Gruppe abhydriert und der freie Dipeptidester mit DCC/HOBt an Boc-L-Tyr-OH gekuppelt. Nach Verseifung des Tripeptids setzt man mit L-Phe-OMe zum Tetrapeptid um (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 33), das nach erneuter Verseifung mit Leucinmethylester zum Pentapeptidester (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 34 gekuppelt wird. Nach Verseifung mit 1 N Natronlauge wird die Boc-Schutzgruppe mit 1.2 N HCl/Eisessig entfernt.

Das Peptid wird noch über eine Kieselgelsäule chromatographisch mit Methanol/Benzol/Chloroform/Wasser (40:40:40:5) als Elutionsmittel gereinigt.

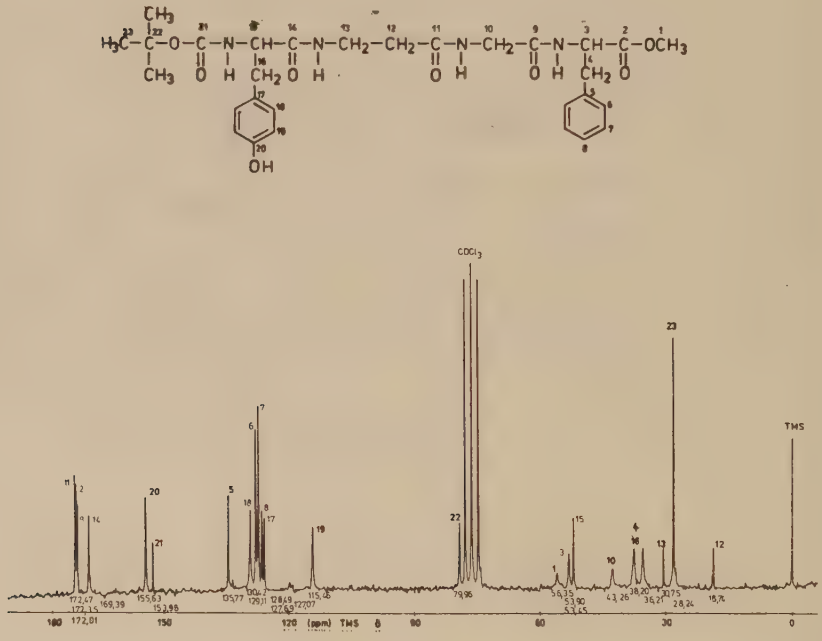


Abb.33: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr-ß-Ala-Gly-Phe-OMe. 230 mg, 1.5 ml DMSO-d_6, 53 100 Pulsinterferogramme, 22.628 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

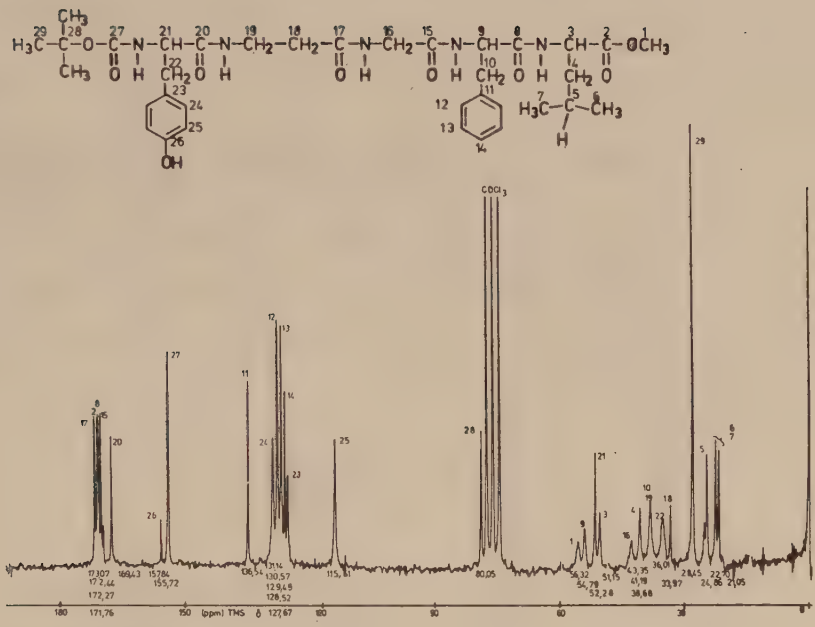
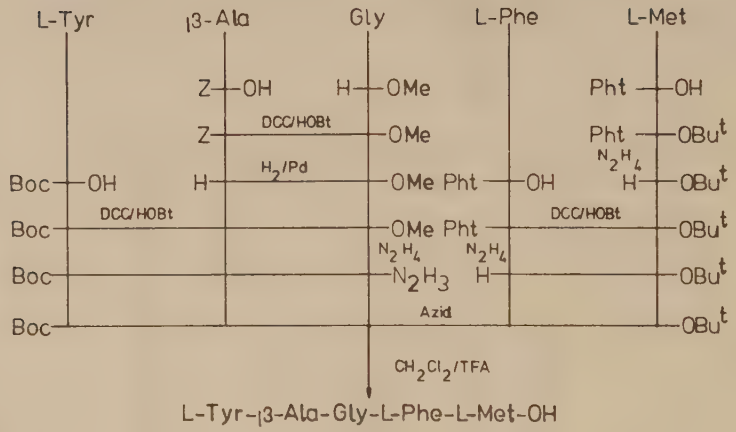


Abb.34: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr-ß-Ala-Gly-Phe-Leu-OMe, 250 mg, 2 ml $CDCl_3$, 69 000 Pulsinterferogramme, 20.115 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

c) Syntheseschema 10.



Syntheseschema 10: Darstellung [ß-Ala]^2-Methionin-Enkephalin

Nach diesem Schema wird das [ß-Ala]^2-Derivat des Methionin-Enkephalins synthetisiert. Wie bei den beiden vorangegangenen Synthesen wird wiederum das Dipeptid Z-ß-Ala-Gly-OMe aus Z-ß-Ala-OH und H-Gly-OMe hergestellt. Nach Abhydrieren der Z-Gruppe und Kuppeln mit Boc-L-Tyr-OH zum Tripeptid Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-OMe wird mit Hydrazinhydrat zum Hydrazid umgesetzt, das über eine Azidkupplung mit Phe-Met-OBu^t, hergestellt aus Pht-L-Phe-L-Met-OBu^t, zum beidseitig geschützten Pentapeptid umgesetzt wird (^{13}C-NMR-Spektrum, siehe Abbildung 35). Die beiden säurelabilen Gruppen (Boc-Gruppe und tert.-Butylester) werden mit TFA/Methylen-

chlorid entfernt. Chromatographiert wird das Produkt wiederum über Kieselgel.

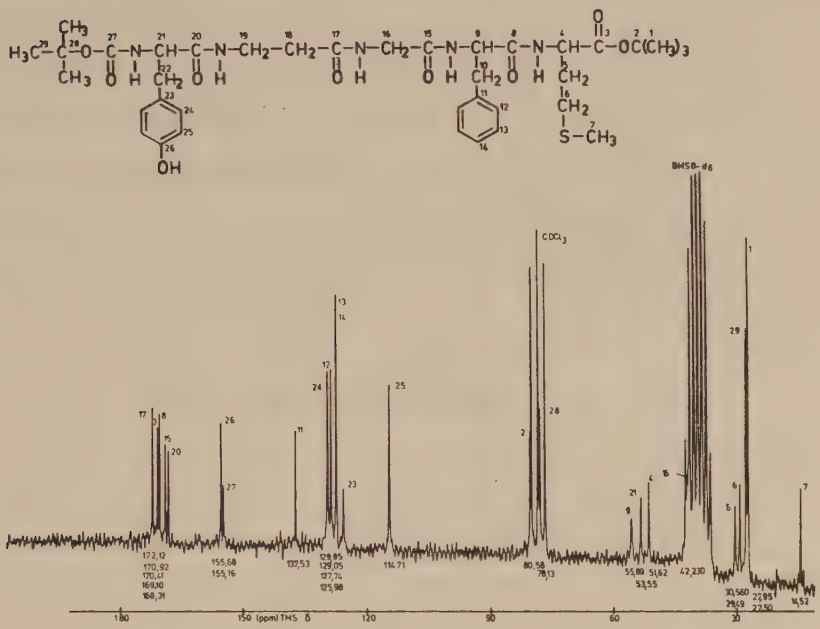
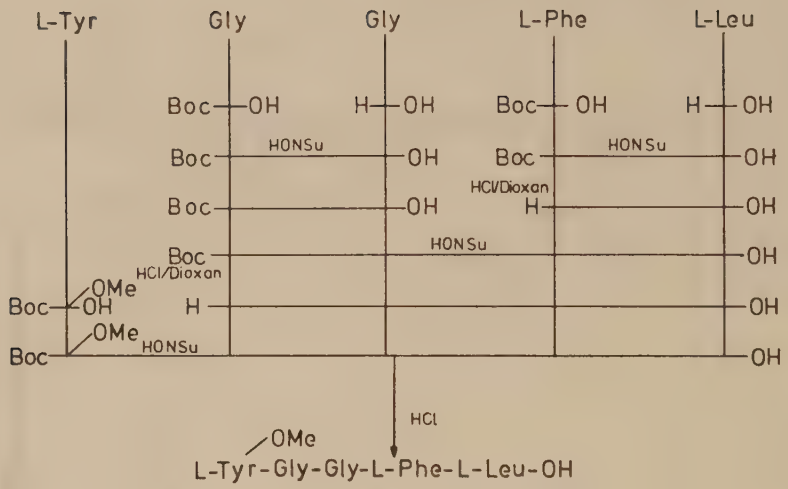


Abb.35: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Tyr-ß-Ala-Gly-Phe-Met-OBu^t; 260 mg, 2 ml $CDCl_3$, 97 800 Pulsinterferogramme, 22.628 MHz, protonenbreitbandentkoppelt

d) Syntheseschema 11.

Schema 11 veranschaulicht den Verlauf der Synthese von [Tyr-OMe]^1-Leucin-Enkephalin. Der Aktivester von Boc-Glycin wird mit einem weiteren Glycin zum Dipeptid umgesetzt. Gleichzeitig setzt man ebenfalls über den Hy-



Syntheseschema 11: Synthese von [Tyr(OMe)]^1-Leucin-Enkephalin

droxysuccinimidaktivester Boc-Phe-OH mit Leucin zum Dipeptid Boc-L-Phe-L-Leu-OH um. Von diesem wird die Schutzgruppe abgespalten und mit Hilfe von Hydroxysuccinimid an Boc-Gly-Gly-OH gekuppelt. Nach Abspaltung der N-terminalen Schutzgruppe synthetisiert man daraus mit Boc-L-Tyr(OMe)-OSu das Pentapeptid Boc-L-Tyr(OMe)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH. Die Schutzgruppe wird mit konzentrierter Salzsäure entfernt.

4. Abspaltung der Schutzgruppen und chromatographische Reinigung der Enkephaline und Enkephalinderivate

Die Abspaltung der Schutzgruppen wird bei den einzelnen Reaktionsansätzen unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Danach erhält man die Endprodukte in unterschiedlichen Reinheiten. Generell kann gesagt werden, daß Methionin-Enkephalin und die Derivate bei der acidolytischen Deblockierung immer eine größere Anzahl von Nebenprodukten bilden. Dies ist bedingt durch die chemischen Eigenschaften des Methionins. Der Schwefel in γ-Stellung wird unter sauren Bedingungen leicht zum Sulfoxid bzw. Sulfon oxydiert, ferner kann er leicht von elekrophilen Kationen, die sich beim Abspalten der Schutzgruppen bilden, angegriffen werden. So bildet sich bei acidolytischer Entfernung der Boc-Schutzgruppe über das tert.-Butylkation das S-tert.-Butylderivat. Durch Zugabe von Anisol als Kationenfänger kann diese Reaktion größtenteils unterdrückt werden.

Von den untersuchten Abspaltungsbedingungen sind zwei zu erwähnen, bei denen die rohen Endprodukte relativ rein anfallen. Dies ist einmal die Deblockierung mittels 5N HCl in peroxidfreiem Dioxan. Die Reaktion ist bei Raumtemperatur innerhalb 30 Minuten beendet. Das Leucinderivat erhält man in einer Reinheit von 90-95 %, während das methioninhaltige Peptid bestenfalls bis zu 80 % rein erhalten werden kann. Ähnliche Ergebnisse

bekommt man bei der Entacylierung mit konzentrierter Salzsäure unter Eiskühlung und Stickstoffatmosphäre. Das Peptid wird bei 0°C 8 Minuten mit konzentrierter Salzsäure kräftig gerührt, die dann am Rotationsverdampfer im Hochvakuum bei 5°C Badtemperatur abgezogen wird. Letzte Spuren von HCl entfernt man im Hochvakuum über KOH.

Die biologisch aktiven Peptide erhält man in reiner Form entweder durch Gel-Permeationschromatographie an Sephadex LH 20 oder G 10 Material oder durch Affinitätschromatographie an Kieselgel Si-60 eluiert wird mit Methanol, Methanol mit geringen Zusätzen von Wasser, 5-10%iger Essigsäure oder einer Mischung von Methanol/ Benzol/ Chloroform/Wasser im Verhältnis 40:40:40:5 (siehe Abbildung 36 und 37).

Zur Überprüfung der analytischen Reinheit werden die Peptide mittels HPLC getestet. Die verwendete Säule hat eine Länge von 250 mm und einen Durchmesser von 4 mm . Die Füllung besteht aus RP-8 Material mit 5 µ Korngröße. Eluiert wird mit Methanol/Wasser 90:10 oder 80:20 und einem geringen Zusatz von Schwefelsäure oder Phosphorsäure bei pH 4. Die Durchflußrate beträgt etwa 1.8 ml/min. Abb.38 zeigt die Elutionsdiagramme von Enkephalinen und Derivaten.

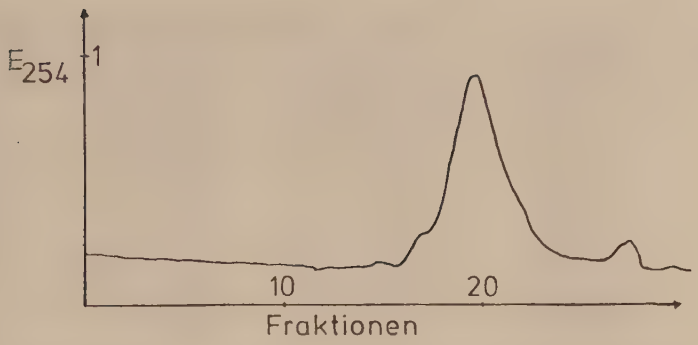


Abb.36: Gelfiltration von Leucin-Enkephalin an Sephadex LH 20, Säule 95 x 2.6 cm. Elution mit Methanol/ Wasser 9:1. Durchflußrate 0.9 ml/min. Fraktionsvolumen 4.5 ml.

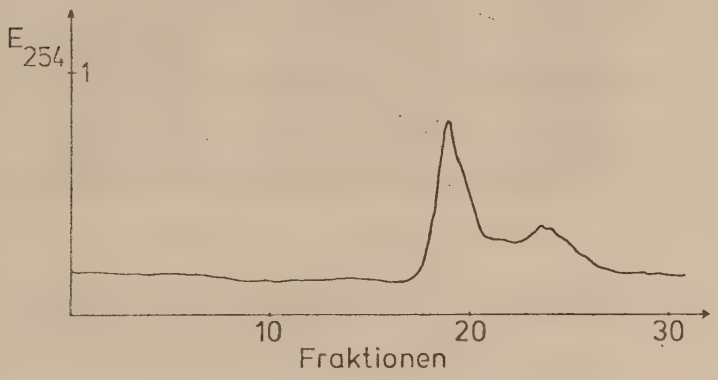


Abb.37: Gelfiltration des Methionin-Enkephalins an G 10. Säule 99 x 2.3 cm. Elution mit 10%iger Essigsäure. Durchflußrate 1.2 ml/min. Fraktionsvolumen 5 ml.

Abb.38: HPLC-Chromatogramme der an Kieselgel Si 60, G 10 bzw. LH 20 gereinigten Enkephaline und Derivate.
Bedingungen: RP 8-Säule (25 cm x 0.46 cm,5 µm). Mobile Phase: Methanol/Wasser/8:2. Zusatz von Schwefelsäure (pH 4.4). Durchflußrate 1.8 ml/min. bei 160 bar. UV-Absorption bei 254 nm.
Es bedeuten: a) Leucin-Enkephalin
b) Methionin-Enkephalin
c) [ß-Ala]^{2}-Leucin-Enkephalin
d) [Tyr(OMe)]^{1}-Leucin-Enkephalin

5. Bestimmung der biologischen Aktivität

Morphin, sowie die beiden endogenen Opiate Methionin- und Leucin-Enkephalin bewirken in den Neuronen einen Anstieg des c-AMP-Spiegels. Da die Nervenzellen sich nicht teilen, können sie nicht in Kulturen gezüchtet werden. Nirenberg et al.[88] fanden,daß Nervenzellen des Typs Neuroblastoma x Glioma, die durch Kreuzung der Tumorzellen Neuroblastoma mit den Tumorzellen Glial entstehen, in Nährlösungen gezüchtet werden können. Diese Hybridzellen haben Eigenschaften, die denen der Nervenzellen weitgehend entsprechen [89]. Mit ihnen können nun Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus der Opiate gemacht werden. Methionin- und Leucin-Enkephalin kann mit dem Typ 108 CC 15 getestet werden.

Die Erhöhung des intrazellulären c-AMP-Wertes, der in diesen Zellen durch Prostaglandin-E_1 (PGE_1) hervorgerufen wird [90], kann durch die Wirkung von Narkotika und Enkephaline verhindert werden. Aufgrund dieser Tatsache kann mit diesen Hybridzellen die Wirkung der Opiate auf das Adenylatcyclase-System untersucht werden.

Der Test wird wie folgt durchgeführt: Vier Tage vor der experimentellen Inkubation werden etwa 2.10^6 lebensfähige Zellen pro Platte vom Typ 108 CC 15 in Plastik-Petrischalen, die 20 ml Nährboden enthalten, gezüchtet. Nach der experimentellen Inkubation (10 Minuten bei 37°C) wird in Gegenwart von Prostaglandin-E_1 und der

Peptide die intrazelluläre Konzentration an c-AMP bestimmt [91,92]. Als Kontrollsubstanz dient ein von der Arbeitsgruppe E.Wünsch synthetisiertes Leucin-Enkephalin. Bei den im Test verwendeten Hybridzellen ist kein Unterschied in der Aktivität zwischen Leucin- und Methionin-Enkephalin festzustellen.

Ergebnisse:

Test 1. Methionin-Enkephalin 1 + 2

Kontrolle (Basiswert) 21 pM c-AMP, SD8, VK 39

Prostaglandin E_1 3.10^{-7}M 1188 pM c-AMP, SD* 124, VK* 10

	10^{-9}M	10^{-8}M	10^{-7}M
Methionin-Enkephalin 1	1149 pM c-AMP	347	212
	81 SD	52	13
	8 VK	15	6
Methionin-Enkephalin 2	553	220	153
	34	11	12
	6	5	8
Kontrolle Wünsch Leucin-Enkephalin	476	129	105
	39	27	12
	8	21	11

*SD = Standardabweichungen

**VK = Variationskoeffizient

Test 2. Leucin-Enkephalin 1 + 2

Kontrolle 14 pM c-AMP, SD 1, VK 5

Prostaglandin E_1 1127 pM c-AMP SD 215, VK 19

	10^{-9}M	10^{-8}M	10^{-7}M
Leucin-Enkephalin 1	1082 pM c-AMP	593	334
	215 SD	88	40
	10 VK	17	12
Leucin-Enkephalin 2	1096	895	443
	33	111	63
	3	12	14
Kontrolle	593	229	142
	98	25	12
	17	11	9

Erklärung zu den Abbildungen 39 und 40 auf den folgenden Seiten. Auf derOrdinate wird die Verringerung des c-AMP-Spiegels als Funktion der Enkephalin-Konzentration gemessen. Der Startwert (größte c-AMP-Konzentration) wird durch Verabreichung von 3.10^{-7}Mol Prostaglandin E_1 ermittelt. Pro Messung werden jeweils 3 Platten parallel inkubiert und daraus der Mittelwert ermittelt.

Herrn K.Hönn, Arbeitsgruppe Prof.Dr.B.Hamprecht, sei für die Durchführung des Aktivitätstests an dieser Stelle gedankt.

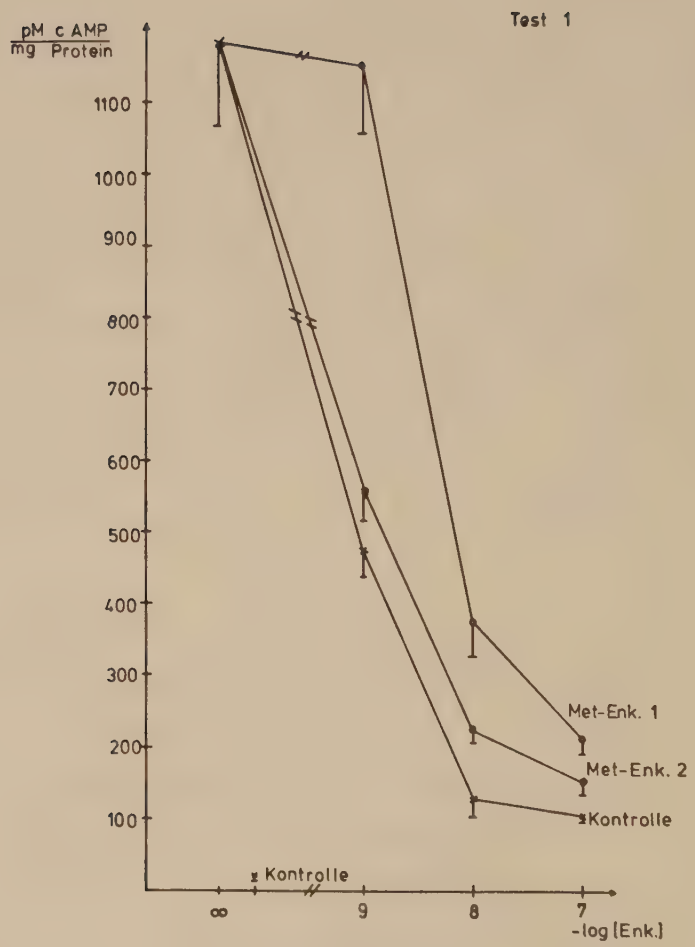


Abb. 39: Bestimmung der biologischen Aktivität der Enkephaline über die Erniedrigung des c-AMP-Spiegels

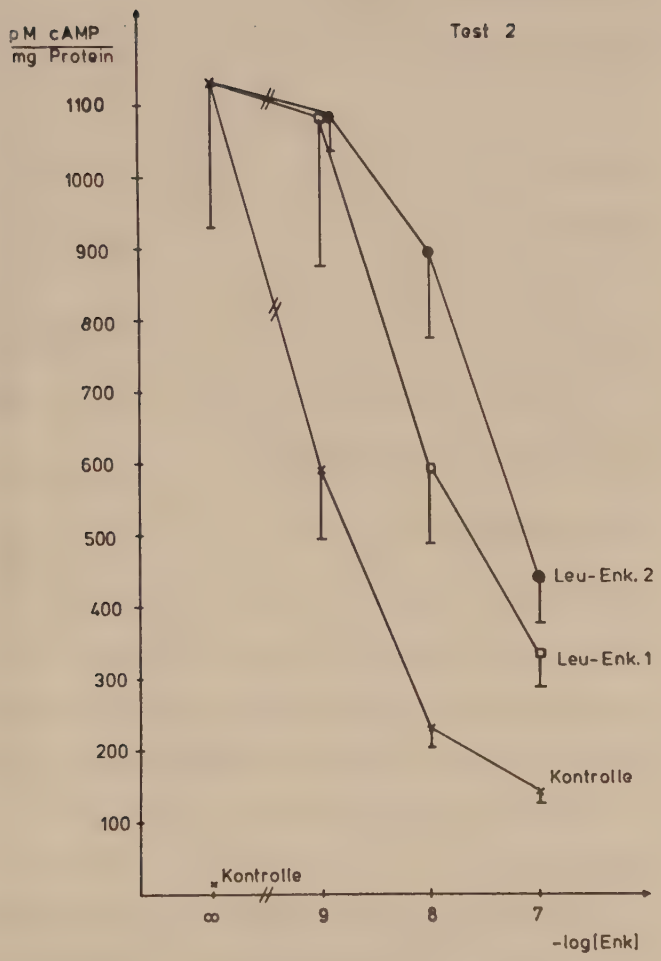


Abb. 40 : Bestimmung der biologischen Aktivität über die Erniedrigung des c-AMP-Spiegels

V. EXPERIMENTELLER TEIL

A. Spektroskopische Methoden

Kernresonanzspektroskopie

Die Aufnahme der PFT-$^{13}C\{^1H\}$-NMR-Spektren erfolgte mit einem Bruker HFX-90-Multikerngerät (22,628 MHz für ^{13}C) und einem WP-80-NMR-Spektrometer (20,115 MHz) ebenfalls von der Fa.Bruker, Karlsruhe. Die Spektren wurden durch Akkumulation von ^{13}C-Impulsinterferogrammen (2,5-3,5 µsec; 0.4 sec/scan) und anschließender Fouriertransformation (BNC-28 Rechner) des akkumulierten Interferogramms erhalten. Es wurden ungefähr 200-350 mg der zu messenden Substanz in jeweils 1,5 ml des entsprechenden Lösungsmittels aufgelöst.

Massenspektrometrie

Die Elektronenstoß-Massenspektren wurden mit dem Gerät MAT 711 der Fa.Varian, Bremen, gemessen (Direkteinlaß, 70 eV Elektronenenergie, Ionenquelltemperatur bis 250°C). Die Felddesorptionsspektren wurden mit einer FD-Ionenquelle desselben Gerätetyps aufgenommen. Die Emitterheizströme sind in den einzelnen Massenspektren angegeben.

Drehwerte

Die Drehwerte wurden mit einem Zeiss OLD-5-Polarimeter bei 578, 546, 436, 405 und 365 nm gemessen. Der $[\alpha]_D^{20}$-Wert für 589 nm wurde durch graphische Extrapolation ermittelt. Ein Teil der Drehwerte wurde auf einem Perkin-Elmer 141-Polarimeter gemessen, wobei der $[\alpha]_D^{20}$-Wert direkt abgelesen werden kann.

B. Chromatographische Methoden

Alle dargestellten Verbindungen wurden mittels Dünnschichtchromatographie unter Verwendung von DC-Fertigplatten 60 F_{254} der Fa.Merck, Darmstadt, auf Einheitlichkeit überprüft. Dazu wurden folgende Fließmittelsysteme verwendet:

A: n-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1

D: Chloroform/Methanol/Benzol/Wasser 40:40:40:5

Die Chromatogramme wurden mit Ninhydrinlösung[93)], Tolidin-Lösung [93)] oder einem Schwefelsäure-Methanol (3:1)-Gemisch besprüht und anschließend bei 120°C entwickelt.

Die flüssigkeitschromatographischen Trennungen wurden auf vier verschiedenen Säulen mit den folgenden Parametern durchgeführt: Glassäulen Länge 50 cm, Durchmesser 3 cm, Totalvolumen 350 ml; Länge 40 cm, Durchmesser 2 cm, Totalvolumen 125 ml; Säule K 26/40 (40 x 2,6 cm, V_t= 212 ml) Säule K 26/100 (100 x 2,6 cm, V_t= 530 ml) (Fa. Pharmacia, Schweden). Als Säulenfüllmaterialien fanden Kieselgel 60, Korngröße 230 - 400 mesh ASTM, der Fa.Merck, Darmstadt, sowie Sephadex LH 20, Sephadex G 15 und Sephadex G 10 der Fa.Pharmacia, Uppsala, Verwendung. Es wurden Fraktionssammler der Firmen LKB, Stockholm, (Typ Ultrorac 7000) und ISCO (Typ Golden Retriever, Modell 328) mit nachgeschaltetem Durchflußphotometer (E_{254}nm) benutzt. Für die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden folgende Bauteile zu einer Einheit zusammengestellt: Doppelkolben-Hochdruckpumpe M 6000 A der Fa.Waters Assoc.;

Hochdruckinjektionssystem Modell 7120 der Fa.Rheodyne, Berkeley, Calif., UV-Zweistrahlphotometer der Fa.Kontron und Schreiber, Typ 56 der Fa.Perkin-Elmer. Eine weitere Chromatographiereinheit,bestehend aus einem UFC 1000 Hupe und Busch Pumpensystem, einem Hochdruck-Injektionssystem Modell 7125 der Fa.Rheodyne, Berkeley, einem UV-Doppelstrahlphotometer der Fa.Latek, Heidelberg, und einem Schreiber der Fa.Perkin-Elmer, Überlingen, fand ebenfalls Verwendung.

Säulenfüllung: Die Trennsäule (Stahl, 250 x 4,6 mm) wurde nach einer modofizierten Viskositätsmethode gepackt: 2,8 g Lichrosorb RP 8,7 µm, Fa.Merck werden unter Rühren in 15 ml Toluol suspendiert und 2 Minuten mit Ultraschall behandelt. Dann gibt man zu dieser Suspension 20 ml Cyclohexanol und behandelt nochmals fünf Minuten mit Ultraschall. Die so vorbehandelte Suspension wird in das Füllrohr gegossen und das Säulenmaterial durch Pumpen von n-Hexan mit maximal möglichem Druck in die Trennsäule gepresst. Die theoretische Bodenzahl der so gepackten Säule ermittelt man nach folgender Formel:

$n = 5.54\ (t_R/W_{0,5})^2$ (t_R = Retentionszeit, $W_{0,5}$ = Peakbreite in halber Höhe). Für Benzol ergibt sich somit 6500 theoretische Böden (isokratische Elution:Methanol-Wasser 9:1; 1,8 ml Min) mit t_R= 150 sec, $W_{0,5}$ = 4,45 sec.

C. Sonstige Geräte

Die Schmelzpunkte wurden auf einem Schmelzpunktsbestimmungsapparat nach Dr.Tottoli der Fa.Büchi, Flavil, Schweiz, gemessen und sind nicht korrigiert.

Eine Gerätekombination (pH-Meter E 512 und Impulsomat E 473) der Fa.Metrohm, Schweiz, diente zur Messung des pH-Wertes und als pH-Stat.

Die Aminosäurenanalysen wurden am Beckmann Unichrom Analysator bzw. einem automatischen Biotronik Chromatographiersystem LC 6000 E durchgeführt. Vor Auftragen auf das Gerät wurden die Proben 24 Stunden mit 6N HCl bei 120°C hydrolisiert. Die Ampullen wurden in der Kälte unter Hochvakuum zugeschmolzen.

D. Chemikalien

Alle Lösungsmittel wurden nach den üblichen Vorschriften getrocknet und anschließend über eine 140 cm lange Vigreux-Kolonne unter Ausschluß von Feuchtigkeit destilliert. Sie werden über Molekularsieben mit 3 bzw. 4 Å (Merck, Darmstadt) aufbewahrt.

Die verwendeten Aminosäuren sind ausschließlich Produkte der Fa.Merck und haben alle, außer Glycin, L-Konfiguration. Die folgenden Verbindungen wurden nach den angegebenen Literaturstellen hergestellt: tert.-Butyloxycarbonylazid (Boc-Azid) aus Carbazinsäure-tert.-butylester (Carbazat) und Natriumnitrit in Eisessig [94]; Benzyloxycarbonylchlorid aus Benzylalkohol und Phosgen [95].

1-Hydroxybenzotriazol wurde nach [79] aus ortho-Nitro-Chlorbenzol und Hydrazinhydrat hergestellt.

N-Hydroxysuccinimid wurde von der Fa.Senn-Chemicals, Dielsdorf, Schweiz, bezogen.

Alle anderen verwendeten Chemikalien sind Erzeugnisse der Fa.Merck, Darmstadt. Der Reinigungsgrad war entweder pro synt oder pro analysi.

Zur Berechnung der Molekulargewichte wurden die folgenden Atomgewichte verwendet:
C = 12,011; H = 1,008; N = 14,007; O = 15,999; S = 32,064; Cl = 35,453; F = 18,998.

Die einzelnen Boc-Aminosäuren werden, falls nichts anderes erwähnt, am pH-Stat in einem Dioxan/Wasser-Gemisch 1:1 aus der entsprechenden Aminosäure und Boc-Azid hergestellt. Der pH-Wert und die Reaktionsdauer werden nach Lit.96) gewählt. Zur Aufarbeitung wird das alkalische Reaktionsgemisch mit Essigester überschichtet und unter starkem Rühren angesäuert. Nach Neutralwaschen mit gesättigter Kochsalzlösung werden die geschützten Aminosäuren aus Essigester/Petrolether ausgefällt.

L-Tyr(Bzl)-OH wurde wie üblich über den Tyr-Kupferkomplex und Benzylbromid hergestellt [97]. In Abänderung dazu wurde der größte Teil der Kupferionen mit dem Natriumsalz von EDTA entfernt; die letzten Kupferionenspuren wurden mit Schwefelwasserstoff ausgefällt. Durch diese Abänderung erhält man das Produkt in reinerer Form und besseren Ausbeuten.

E. Arbeitsvorschriften

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESESCHEMA 1 (s.S. 22)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosin (Boc-L-Tyr(Bzl)-OH

Hergestellt aus L-Tyr(Bzl)-OH und Boc-N_3 nach Vorschrift[96].

Ausbeute: 29 g (78 %)

Fp.: 113-114°C, Lit. 95-96°C [97], 108-109°C [98]

Rf_A: 0.78, Rf_D: 0.58

$[\alpha]_D^{20}$: +5° (c=1, HAc), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +5.5° (c=1, HAc)[96]

$C_{21}H_{25}NO_5$ (371.433) Ber: C 67.90 H 6.78 N 3.77

Gef: C 68.31 H 7.36 N 3.95

Glycyl-glycinmethylester.Hydrochlorid (H-Gly-Gly-OMe.HCl)

Man digeriert 26.4 g (0.2 Mol) in 300 ml Methanol und kühlt auf 0°C ab. Bei dieser Temperatur läßt man 18 ml (0.24 Mol) Thionylchlorid langsam zutropfen, wobei die Temperatur nicht über +5°C ansteigen darf. Nach Zugabe des Thionylchlorids wird auf Raumtemperatur erwärmt und noch 2 Stunden gerührt. Danach wird etwas Methanol abgezogen, wobei bereits nach kurzer Zeit das Produkt ausfällt. Im Kühlschrank wird die Fällung vervollständigt, das Produkt abgesaugt, mit wenig eiskaltem Methanol und Ether gewaschen und im Vakuum über pulverisiertem Kaliumhydroxid getrocknet.

Ausbeute: 35.4 g (97.3 %)

Fp.: 132-134°C

Rf_A: 0.09, Rf_D: 0.13

$C_5H_{11}N_2O_3Cl$ (182.607) Ber: C 32.88 H 6.07 N 15.34 Cl 19.41

Gef: C 32.85 H 6.46 N 15.21 Cl 20.51

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycinmethylester (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe)

Zu einer Lösung von 11.1 g (0.3 Mol) Boc-L-Tyr(Bzl)-OH in 200 ml DMF gibt man nacheinander 6.0 g (0.033 Mol) Gly-Gly-OMe.HCl, 4.05 g (0.03 Mol) HOBt und 3.03 g (0.03 Mol) N-Methylmorpholin hinzu und kühlt auf -10°C ab. Nach ca.10 Minuten gibt man 6.8 g (0.033 Mol) DCC, gelöst in wenig DMF und auf -10°C abgekühlt, innerhalb 5 Minuten dazu. Man rührt noch 1 Stunde bei -10°C und läßt die Temperatur danach langsam auf Raumtemperatur kommen. Nach 18 Stunden saugt man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab (bei 0°C) und entfernt das Lösungsmittel im Vakuum bei 40°C Badtemperatur. Der ölige, gelb gefärbte Rückstand wird in Essigester aufgenommen, die Lösung von ausgefallenen Spuren Dicyclohexylharnstoff klar filtriert und dann je dreimal mit 5 %-iger Natriumhydrogencarbonatlösung, Wasser, 2N Citronensäurelösung und Wasser gewaschen. Die Essigesterphase wird über Natriumsulfat getrocknet,etwas eingeengt und mit Petrolether versetzt, bis die Lösung leicht trüb erscheint. Im Kühlschrank kristallisiert über Nacht das Produkt aus.

Ausbeute: 12.7 g (84,8 %)

Fp.: 112-114°C

Rf_A: 0.74, Rf_D: 0.7

$[\alpha]_D^{20}$: +13.6° (c=1.45, MeOH)

$C_{26}H_{33}N_3O_7$ (499.56) Ber: C 62.51 H 6.65 N 8.41

Gef: C 62.46 H 6.61 N 8.31

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OH)

Man löst 5.6 g (11.2 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OMe in etwa 50 ml Methanol, gibt einige Tropfen Wasser dazu und versetzt bei Raumtemperatur mit 11.2 ml 1N Natronlauge. Mittels Dünnschichtchromatographie wurde die Reaktion verfolgt. Nach drei Stunden hatte sich das Ausgangsprodukt zu etwa 90 % umgesetzt. Nach dieser Zeit wird die Verseifung beendet. Die alkalische Reaktionsmischung wird mit Wasser verdünnt und mit Ether zweimal ausgeschüttelt, um lipophile Verunreinigungen zu entfernen. Dann wird bis zur Trockene eingeengt, der Rückstand in Essigester aufgenommen, klar filtriert und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen und Zugabe von Petrolether fällt das Produkt in der Kälte aus.

Ausbeute: 3.9 g (72.3 %)

Fp.: 157-160°C

Rf_A: 0.66, Rf_D: 0.34

$[\alpha]_D^{20}$: +13.3° (c=0.5, MeOH)

$C_{25}H_{31}N_3O_7$ (485.537) Ber: C 61.84 H 6.43 N 8.65

Gef: C 61.45 H 5.96 N 8.54

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin (Boc-L-Phe-OH)

Boc-L-Phe-OH wird aus 82.2 g (0.5 Mol) Phenylalanin und 79 ml Boc-N_3 (0.55 Mol) nach Schnabel [96] hergestellt.

Ausbeute: 102.8 g (77.5 %)

Fp.: 83-84°C, Lit. 84-86°C [96]

Rf_A: 0.88, Rf_D: 0.5

$[\alpha]_D^{20}$: -4,0° (c=1, HAc), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -4.0° (c=1,HAc) [96]

$C_{14}H_{19}NO_4$ (265.308) Ber: C 63.38 H 7.28 N 5.27

Gef: C 63.68 H 6.22 N 5.27

L-Methioninmethylester.Hydrochlorid (L-Met-OMe.HCl)

L-Met-OMe.HCl wird aus 74.6 g (0.5 Mol) Methionin, 71.4 g (0.6 Mol) Thionylchlorid und 700 ml Methanol hergestellt.

Ausbeute: 80.9 g (81 %)

Fp.: 144°C, Lit. 145-146°C [100]

Rf_A: 0.48, Rf_D: 0.54

$[\alpha]_D^{20}$: +26.3° (c=1,0, H_2O), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +26.8° (c=5,H_2O) [100]

$C_6H_{14}NO_2SCl$ (199,700) Ber:C 36.08 H 7.06 N 7.01 S 16.05 Cl 17.7

Gef:C 35.92 H 7.44 N 6.95 S 15.20 Cl 16.9

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-methioninmethylester (Boc-L-Phe-L-Met-OMe)

5.3 g (0.02 Mol) Boc-L-Phe-OH und 4.4 g (0.022 Mol) H-L-Met-OMe werden in 200 ml absolutem DMF gelöst, mit 5.4 g (0.04 Mol) HOBt versetzt und auf -15°C abgekühlt. Nach 20 Minuten werden 4.9 g (0.022 Mol) DCC, gelöst und vorgekühlt in DMF, zugegeben und 1 Stunde in der Kälte, dann 18 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird bei -10°C abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer im Hochvakuum bei 40°C Badtemperatur abdestilliert und der Rückstand in Essigester aufgenommen. Nach Klarfiltrieren und dreimaligem Waschen mit jeweils 100 ml 5 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung,

Wasser, 2N Citronensäure und Wasser wird über Natriumsulfat getrocknet, etwas eingeengt und mit Petrolether bis zur leichten Trübung versetzt.

Ausbeute: 6.8 g (83 %)

Fp.: 89-91°C, Lit. 84-85°C [101]

Rf_A: 0.85, Rf_D: 0.73

$[\alpha]_D^{20}$: -19.6° (c=1, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -20.7° (c=1,MeOH)[101]

$C_{20}H_{30}O_5N_2S$ (410.529) Ber: C 58.52 H 7.37 N 6.83 S 7.80

Gef: C 58.53 H 8.01 N 7.17 S 8.14

L-Phenylalanyl-L-methioninmethylester.Trifluoracetat (H-L-Phe-L-Met-OMe.TFA)

3.7 g (9 mMol) Boc-L-Phe-L-Met-OMe werden in 60 ml einer Mischung von Trifluoressigsäure/Methylenchlorid (Verhältnis 1:1) gelöst und bei Raumtemperatur noch 30 Minuten gerührt. Dann wird ebenfalls bei Raumtemperatur das TFA/CH_2Cl_2-Gemisch am Rotationsverdampfer entfernt. Der gelbliche,ölige Rückstand wird in Essigester aufgenommen und mit Petrolether versetzt. Das Produkt konnte aber nur als Öl erhalten werden.

Ausbeute: 2.3 g (60.2 %)

Rf_A: 0.55, Rf_D: 0.45

$[\alpha]_D^{20}$: -5.5° (c=0.99, MeOH)

$C_{17}H_{23}N_2O_5SF_3$ (424,438) Ber: C 48.11 H 5.46 N 6.60 S 7.55

Gef: C 48.74 H 5.72 N 6.70 S 8.72

L-Phenylalanyl-L-methioninmethylester.Hydrochlorid (H-L-Phe-L-Met-OMe.HCl)

Man löst 2.8 g (7 mMol) Boc-L-Phe-L-Met-OMe in 40 ml 1,2N HCl in Eisessig und rührt bei Raumtemperatur 20 Minuten lang. Danach wird am Rotationsverdampfer das Abspaltungsreagenz bei 30° C Badtemperatur abdestilliert. Es bleibt eine weiße, schaumige Masse zurück. Zur vollständigen Entfernung der Salzsäure wird der Rückstand mehrere Male in Methanol gelöst, das dann wieder abgezogen wird. Den so behandelten Rückstand löst man in Ethanol und fällt das Produkt mit Ether aus.

Ausbeute: 2.2 g (91 %)

Fp.: 120°C, Lit. 123-124°C [101]

Rf_A: 0.59, Rf_D: 0.37

$[\alpha]_D^{20}$: -4.5° (c=1,MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -4.6 (c=1,0,MeOH) [101]

$C_{15}H_{23}N_2SCl$ (346.877) Ber: C51.93 H 6.68 N 8.07 S 9.23 Cl 10.22

Gef: C51.52 H 6.55 N 8.03 S 9.62 Cl 10.30

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methioninmethylester (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe)

Zur Lösung von 2.9 g (0.6 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OH und 2.9 g (7.2 mmol) H-L-Phe-L-Met-OMe.TFA in 70 ml Dimethylformamid wird nacheinander bei -10°C 1.62 g (12 mMol) HOBt und 0.8 ml (7.2 mMol) N-Methylmorpholin gegeben. Dazu tropft man rasch eine vorgekühlte Lösung von 1.48 g (7.2 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in DMF. Man läßt noch eine Stunde bei -10°C und vierzehn Stunden bei Raumtempe-

ratur reagieren. Danach wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, das Filtrat bei 40°C Badtemperatur bis zum Zurückbleiben eines öligen Rückstandes engeengt. Dieser wird in Essigester aufgenommen, klar filtriert, basisch mit je dreimal 70 ml 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung, sauer mit dreimal 70 ml 2N Citronensäurelösung und schließlich mit dreimal 70 ml Wasser neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die Essigesterphase mit Petrolether versetzt und im Kühlschrank aufbewahrt. Dabei kristallisiert das Produkt in Form feiner weißer Nadeln aus. Umkristallisation aus Essigester/Petrolether.

Ausbeute: 4.2 g (90 %)

Fp.: 155-159°C

Rf_A: 0.61, Rf_D: 0.77

$[\alpha]_D^{20}$: +9° (c=1, MeOH)

$C_{40}H_{51}N_5O_9S$ (777.938) Ber: C 61.76 H 6.60 N 9.00 S 4.11

Gef: C 60.93 H 6.22 N 8.80 S 4.60

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH)

Man löst 1.55 g des beidseitig geschützten Pentapeptids in möglichst wenig Methanol, gibt 2-3 Tropfen Wasser und 2 ml 1 N Natronlauge zu. Nach 12-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Verseifung abgebrochen. Nicht umgesetztes Ausgangsprodukt wird nach Verdünnen mit Wasser durch Extraktion mit Ether entfernt. Danach wird die Wasserphase neutralisiert, eingeengt, über Phos-

phorpentoxid scharf getrocknet und in absolutem Methanol aufgenommen. Nach Zugabe von Ether fällt das Produkt in der Kälte aus.

Ausbeute: 1.1 g (72 %)

Fp.: 178°C

Rf_A: 0.55, Rf_D: 0.41

$[\alpha]_D^{20}$: -12.4 (c=0.9, DMF), $[\alpha]_D^{20}$: +11.0)(c=0.48, MeOH)

$C_{39}H_{49}N_5O_9S$ (763.907) Ber: C 61.32 H 6.46 N 9.16 S 4.19

Gef: C 61.35 H 6.59 N 8.57 S 4.01

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH) (Methionin-Enkephalin)

Zu 380 mg (0.5 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH, 2.7 g (25 mMol) Anisol und 390.6 mg (5 mMol) 2-Mercaptoethanol kondensiert man bei -15°C Fluorwasserstoffgas ein, das zuvor überKobalttrifluorid getrocknet wurde. Man läßt nun 30 Minuten bei 0°C reagieren. Daraufhin verbläst man den Fluorwasserstoff in der Kälte (Dreiringstickstoff). Das als Sirup anfallende Produkt wird noch 36 Stunden im Hochvakuum über pulverisiertem Kaliumdroxyd getrocknet, um die letzten Spuren von Fluorwasserstoff zu entfernen. Danach nimmt man das Rohprodukt in Wasser auf, extrahiert die Wasserphase dreimal mit Ether, um das Anisol vollständig zu entfernen. Anschließendes Lyophilisieren der Wasserphase liefert ein Rohprodukt, das durch Chromatographie an Sephadex LH 20 mit Methanol als Elutionsmittel gereinigt wird. Die Fraktionen mit dem sauberen Produkt werden vereinigt, das Methanol wird abdestilliert, der Rückstand in Wasser auf-

genommen und erneut lyophilisiert.

Ausbeute: 53 mg (18.3 %)

Fp.: 193°C

Rf_A: 0.55, Rf_D: 0.54

$[\alpha]_D^{20}$: +29° (c=1,0, MeOH), $[\alpha]_D^{20}$: + 38.4° (c=1,MeOH)

$C_{27}H_{35}N_5O_7S$ (573.669) Ber: C 56.53 H 6.14 N 12.20 S 5.59

Gef: C 56.83 H 5.70 N 12.64 S 5.74

Aminosäurenanalyse:	Phe	Gly	Tyr
Ber:	1.0	2.0	1.0
Gef:	1.0	2.08	0.87

L-Leucinmethylester.Hydrochlorid (H-L-Leu-OMe.HCl)

H-L-Leu-OMe.HCl wird mittels Methanol, Thionylchlorid und Leucin nach [102] hergestellt.Ansatz 0.5 Mol.

Ausbeute: 90 g (99%)

Fp.: 149°C, Lit. 153°C [102]

Rf_A: 0.54, Rf_D: 0.49

$[\alpha]_D^{20}$: +20.3° (c=1,o, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +12.7° (c=2,H_2O)[102]

$C_7H_{16}NO_2Cl$ (181.663) Ber: C 46.28 H 8.33 N 7.71 Cl 19.51

Gef: C 46.65 H 8.96 N 7.91 Cl 20.13

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Phe-L-Leu-OMe)

Man löst 5.3 g (0.02 Mol) Boc-L-Phe-OH und 4 g (0.022 Mol) H-L-Leu-OMe.HCl in 100 ml Methylenchlorid. Dazu gibt man 3 g (0.022 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol und 2.4 ml (0.022 Mol) N-Methylmorpholin und kühlt auf -10°C ab. Bei dieser Temperatur fügt man der Lösung 4.2 g (0.02 Mol) DCC,

gelöst in 20 ml Methylenchlorid (-20°C), zu. Nach 10 Minuten fällt bereits Dicyclohexylharnstoff aus. Zur Vervollständigung der Reaktion rührt man noch vier Stunden bei Raumtemperatur, filtriert danach in der Kälte den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und dampft das Filtrat bei Raumtemperatur ein. Den Rückstand nimmt man in Essigester auf, wäscht je dreimal basisch, sauer und dann neutral. Nach Trocknen über Natriumsulfat versetzt man die Essigesterphase bis zur leichten Trübung mit Petrolether. Nach Stehenlassen bei Raumtemperatur (24 Stunden) beginnt das Produkt als weiße kristalline Substanz auszufallen. Die Fällung wird im Kühlschrank vervollständigt.

Ausbeute: 5.8 g (74.6 %)

Fp.: 105°C

Rf_A: 0.90, Rf_D: 0.81

$[\alpha]_D^{20}$: -23.9° (c=1,02, MeOH)

$C_{21}H_{32}N_2O_5$ (392.496) Ber. C 64.26 H 8.21 N 7.13

Gef: C 64.11 H 8.00 N 7.08

L-Phenylalanyl-L-leucinmethylester.Trifluoracetat (H-L-Phe-L-Leu-OMe.TFA)

Die Lösung von 3.9 g (0.01 Mol) Boc-L-Phe-L-Leu-OMe in 40 ml Methylenchlorid/Trifluoressigsäure (1:1) wird 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird das gesamte Lösungsmittelgemisch abgezogen,der leicht gelb gefärbte Rückstand mehrmals in Methylenchlorid aufgenommen und wieder zur Trockene eingeengt, um restliche Tri-

fluoressigsäure zu entfernen. Danach wird das Produkt im Hochvakuum bei 40°C 6 Stunden lang getrocknet und anschließend 2 Tage über Kaliumhydroxid aufbewahrt.

Ausbeute: 3.37 g (83 %)

Fp.: 164-166°C

Rf_A: 0.62, Rf_D: 0.60

$[\alpha]_D^{20}$: -9.1° (c=1,02, MeOH)

$C_{18}H_{25}N_2O_5F_3$ (406.407) Ber: C 53.19 H 6.20 N 6.89 F 14.02

Gef: C 53.63 H 6.75 N 6.87 F 12.89

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe)

Man kühlt die Lösung von 1.46 g (3 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-OH und 1.22 g (3 mMol) H-L-Phe-Leu-OMe.TFA und 0.41 g (3 mMol) HOBt in DMF auf -10°C ab. Dazu tropft man 0.35 g (3 mMol) N-Ethylmorpholin. Anschließend gibt man 0.68 g (3.3 mMol) DCC, gelöst in möglichst wenig DMF und vorgekühlt auf -10°C, dazu. Man läßt die Kupplung über Nacht bei Raumtemperatur rühren. Dann filtriert man in der Kälte den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff und wäscht diesen mit wenig kaltem DMF nach. Am Rotationsverdampfer wird bei 1 Torr und 40°C Badtemperatur von den vereinigten Filtraten das DMF abdestilliert. Den Rückstand nimmt man in Essigester auf, wäscht mehrmals sauer, basisch und neutral. Die organische Phase wird über Natriumsulfat getrocknet, etwas eingeengt und mit der gleichen Menge Petrolether versetzt. Aus diesem Lösungsmittelgemisch kri-

stallisiert das Produkt in der Kälte nach etwa 4 Tagen aus. Umkristallisiert wird aus demselben Lösungsmittelgemisch

Ausbeute: 1.7 g (74 %)

Fp.: 149-152°C

Rf_A: 0.78, Rf_D: 0.67

$[\alpha]_D^{20}$: +8° (c=1, MeOH)

$C_{41}H_{53}N_5O_9$ (759.901) Ber:C64.83 H 7.03 N 9.21

Gef:C64.40 H 7.27 N 9.06

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

Man löst 750 mg (1 mMol) des beidseitig geschützten Pentapeptids in 20 ml Methanol, gibt 2 Tropfen Wasser hinzu und versetzt mit 1 ml (1 mMol) 1N Kalilauge. Die Lösung hat einen pH-Wert von 13. Nach 150 Minuten sind 50 % des Ausgangsproduktes verseift, wie dünnschichtchromatographisch festgestellt werden kann. Nach vier Stunden wird die Reaktion abgebrochen, obwohl sich das Ausgangsprodukt noch nicht vollständig umgesetzt hat. Man entfernt das meiste Methanol, nimmt den Rückstand in Wasser auf, extrahiert die Wasserphase dreimal mit Ether. Danach wird die wäßrige Lösung mit 1 ml 1N Salzsäure neutralisiert. Die Lösung wird bis zur Trockene eingeengt, über Kaliumhydroxid getrocknet. Das Produkt wird aus Ethanol/Ether umkristallisiert.

Ausbeute: 340 mg (47 %)

Fp.: 154°C

Rf_A: 0.57, Rf_D: 0.43

$[\alpha]_D^{20}$: +1.5° (c=0.5, MeOH)

$C_{40}H_{51}N_5O_9$ (745.874) Ber: C 64.41 N 6.89 N 9.39

Gef: C 64.05 N 6.38 N 9.07

Aminosäurenanalyse:

	Leu	Gly	Phe	Tyr
Ber:	1.0	2.0	1.0	1.0
Gef:	1.0	2.2	0.8	0.9

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) (Leucin-Enkephalin)

223 mg (0.2 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH und 1.66 ml (15 mMol) Anisol werden in einer HF-Apparatur nach Sakakibara [84] mit flüssigem Fluorwasserstoff, der über Kobalttrifluorid vorgetrocknet worden ist, bei 0°C 40 Minuten lang gerührt. Anschließend verbläst man den Fluorwasserstoff mit Dreiringstickstoff in der Kälte. Der zähviskose Rückstand wird dann im Hochvakuum über pulverisiertem Kaliumhydroxid 30 Stunden lang getrocknet. Danach wird die HF-freie Substanz in Wasser gelöst, von unlöslichen Nebenprodukten wird abfiltriert und die Wasserphase dreimal mit Ether extrahiert. Nach Lyophilisieren erhält man 60 mg Leucin-Enkephalin in ziemlich reiner Ausbeute. Hochreines Produkt erhält man durch Chromatographie an Sephadex LH 20 mit Methanol als Elutionsmittel. Nach abermaligem Lyophilisieren fällt das Endprodukt in sehr reiner Form an.

Ausbeute: 18.3 mg (11 %)

Fp.: 194-198°C

Rf_A: 0.55, Rf_D: 0.25

$[\alpha]_D^{20}$: +34.7° (c=0,5, MeOH)

$C_{28}H_{37}N_5O_7$ (555.632 Ber: C 60.53 H 6.71 N 12.60

Gef: C 59.74 H 6.31 N 12.09

Aminosäurenanalyse:	Leu	Gly	Phe	Tyr
Ber:	1.0	2.0	1.0	1.0
Gef:	1.0	2.2	0.8	0.92

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESESCHEMA 2 (s.S.27)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycin (Boc-Gly-OH)

Boc-Gly-OH wird nach Zitat 96 hergestellt.

Ausbeute: 82 %

Fp.: 90-91°C, Lit. 94-95°C [96]

Rf_A: 0.61, Rf_D: 0.53

$C_7H_{13}NO_4$ (175.184) Ber: C 47.99 H 7.48 N 7.99

Gef: C 48.07 H 7.30 N 8.05

Glycinethylester.Hydrochlorid (H.Gly-OEt.HCl)

Die Darstellung von H-Gly-OEt.HCl erfolgt nach Referenz 103.

Ausbeute: 98 %

Fp.: 144-146°C, Lit. 144°C [103]

Rf_A: 0.25, Rf_D: 0.4

$C_4H_{10}NO_2Cl$ (139.582) Ber: C 34.41 H 7.22 N 10.03 Cl 25.40

Gef: C 34.04 H 7.31 N 10.38 Cl 25.42

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-glycinethylester (Boc-Gly-Gly-OEt)

35 g (0.2 Mol) Boc-Gly-OH, 28 g (0.2 Mol) H-Gly-OEt.HCl und 25.30 ml (0.2 Mol) N-Ethylmorpholin werden in 350 ml DMF/CH_2Cl_2 (8:2) gelöst. Man kühlt auf -5°C ab und gibt dann 31.2 g (0.2 Mol) DCC, gelöst in Methylenchlorid und vorgekühlt auf -10°C, dazu. Nach Reaktionszeiten von 1 Stunde bei -5°C und 7 Stunden bei Raumtemperatur wird in der Kälte vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Filtrat zur Trockene eingeengt. Den Rückstand nimmt man in Essigester auf, wäscht alkalisch, sauer und danach neutral. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird der Essigester abdestilliert und das Produkt aus Ethanol/Ether ausgefällt. Umkristallisiert wird aus dem gleichen Lösungsmittelgemisch.

Ausbeute: 34.3 g (66 %)

Fp.: 59-61°C

Rf_A: 0.85, Rf_D: 0.70

$C_{11}H_{20}N_2O_5$ (260.290) Ber: C 50.75 H 7.75 N 10.76

Gef: C 50.31 H 7.43 N 10.43

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-glycin (Boc-Gly-Gly-OH)

20.82 g (80 mMol) Boc-Gly-Gly-OEt werden in 100 ml Methanol/Wasser durch Zugabe von 80 ml (80 mMol) 1N Kalilauge innerhalb 2 Stunden verseift. Dann engt man auf etwa die Hälfte ein und verdünnt mit 150 ml gesättigter Kochsalzlösung. Die Wasserphase wird dreimal mit Ether extrahiert und danach mit 80 ml (80 mMol) 1N Salzsäure

neutralisiert. Diese Lösung wird mit Essigester überschichtet (etwa die gleiche Menge) und 15 Minuten lang kräftig gerührt. Nach Abtrennen der organischen Phase wird die Wasserphase noch zweimal mit 50 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und bis zum Öl eingeengt. Zur Kristallisation wird ein Ethanol/Ether-Gemisch benutzt.

Ausbeute: 17.6 g (94.8 %)

Fp.: 128-130°C

Rf_A: 0.57, Rf_D: 0.28

$C_9H_{16}N_2O_5$ (232.236) Ber: C 46.54 H 6.94 N 12.06

Gef: C 46.93 H 7.14 N 11.67

L-Phenylalaninmethylester.Hydrochlorid (L-Phe-OMe.HCl)

Hergestellt nach 102).

Ausbeute: 94 %

Fp.: 159-161°C, Lit. 159-161°C [104]

Rf_A: 0.69, Rf_D: 0.81

$[\alpha]_D^{20}$: +27.2° (c=1, HAc), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -4.6° (c=5, H_2O)[104]

$[\alpha]_D^{20}$: +17.2° (c=1. MeOH)

$C_{10}H_{14}NO_2Cl$ (215.680) Ber: C 55.69 H 6.54 N 6.49 Cl 16.74

Gef: C 55.44 H 6.58 N 6.54 Cl 16.80

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanin-methylester (Boc-Gly-Gly-L-Phe-OMe)

11.6 g (50 mMol) Boc-Gly-Gly-OH und 10.75 g (50 mMol) L-Phe-OMe.HCl werden zusammen mit 6.76 g (50 mMol) HOBt in Dimethylformamid gelöst und auf -5°C bis -10°C abgekühlt. Sobald diese Temperatur erreicht ist, tropft man 6.35 ml (50 mMol) N-Ethylmorpholin zu und gibt danach eine ebenfalls auf -10°C gekühlte Lösung von 10.3 g (50 mMol) DCC in DMF innerhalb 10 Minuten zu. Zwei Stunden wird noch bei -10°C und 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach dem Absaugen des Dicyclohexylharnstoffs wird das DMF bei 40°C Badtemperatur abdestilliert und das zurückbleibende gelblich-braune Öl in Essigester aufgenommen. Die Essigesterphase wird dann mit 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung, 2N Citronensäure und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die Essigesterphase mit Petrolether versetzt. Aus dieser Lösungsmittelkombination wird das Produkt noch einmal umkristallisiert.

Ausbeute: 15.3 g (78 %)

Fp.: 122-123°C

Rf_A: 0.75, Rf_D: 0.71

$[\alpha]_D^{20}$: +38.4° (c=1, HAc)

$C_{10}H_{27}N_3O_6$ (393.440) Ber: C 58.00 H 6.91 N 10.68

Gef: C 58.11 H 6.84 N 10.62

Glycyl-glycyl-L-phenylalaninmethylester.Hydrochlorid (H-Gly-Gly-L-Phe-OMe.HCl)

9.83 g (25 mMol) Boc-Gly-Gly-L-Phe-OMe werden bei Raumtemperatur 60 Minuten lang in 150 ml 1.2 N HCl/Eisessig (180 mMol) gerührt. Nach Abziehen des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer bei 20°C Badtemperatur erhält man eine schaumig-klebrige Masse. Diese wird fünfmal in 70 ml Methanol aufgenommen und anschließend das Lösungsmittel wieder abdestilliert. Danach wird im Hochvakuum-Exsikkator bei 10^{-2} Torr getrocknet. Das Produkt erstarrt dabei zu einem wachsartigen Brei. Nach Behandeln mit Methanol unter Zusatz von Ether kristallisiert die Verbindung in feinen weißen Nadeln aus.

Ausbeute: 6.2 g (75.2 %)

Fp.: 182-184°C

Rf_A: 0.46, Rf_D: 0.21

$[\alpha]_D^{20}$: +47°, c=1,HAc)

$C_{14}H_{20}N_3O_4Cl$ (329.784) Ber: C 50.99 H 6.11 N 12.74 Cl 10.75

Gef: C 50.57 H 6.15 N 12.49 Cl 10.67

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalaninmethylester (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-OMe)

Man löst 9.3 g (25 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-OH und 8.24 g (25 mMol) H-Gly-Gly-L-Phe-OMe.HCl,sowie 3.375 g (25 mMol) HOBt und 3.17 ml N-Ethylmorpholin in 100 ml absolutem DMF und kühlt auf -5°C ab. Wenn diese Temperatur erreicht ist, gibt man 5.15 g (25 mMol) DCC, gelöst in wenig kaltem DMF,

zu läßt noch weitere 2 Stunden bei 0°C und danach noch 12 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Nach Absaugen des Dicyclohexylharnstoffs in der Kälte und Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Produkt in Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Nach Trocknen der Essigesterphase wird mit Petrolether gefällt.

Ausbeute: 8.5 g (53 %)

Fp.: 107-111°C

Rf_A: 0.74, Rf_D: 0.30

$[\alpha]_D^{20}$: +24.8° (c=1.03, MeOH)

$C_{35}H_{42}N_4O_8$ (646.741) Ber: C 65.00 H 6.54 N 8.66

Gef: C 64.01 H 6.22 N 8.41

N-tert.-Butyloxycarbonyl-0-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanin (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-OH)

6.46 g (10 mMol) des beidseitig geschützten Tetrapeptids Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-OMe werden in 100 ml Methanol/Wasser (v/v = 9:1) gelöst und mit 10 ml 1N Natronlauge 6 Stunden lang verseift. Obwohl die Reaktion nach dieser Zeit noch nicht beendet ist, wird die Verseifung abgebrochen. Die Lösung wird mit 250 ml Wasser versetzt, auf die Hälfte eingeengt, und die Reste des nichtumgesetzten Methylesters werden durch Extraktion mit Ether aus der alkalischen Lösung entfernt. Anschließend wird mit 10 ml 1N Salzsäure neutralisiert und das Produkt daraus mit Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und bis zum Öl eingeengt. Die freie Säure kristallisiert aus einem Etha-

nol/Ether-Gemisch.

Ausbeute: 4.1 g (65 %)

Fp.: 90 - 93°C

Rf_A: 0.71, Rf_D: 0.31

$[\alpha]_D^{20}$: +28.1°, c=1,02, MeOH)

$C_{34}H_{40}M_4O_8$ (632.714) Ber: 64.54 H 6.37 N 8.85

Gef: 63.90 H 6.41 N 8.41

N-tert.-Butyloxycarbonyl-0-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methioninmethylester (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe)

Zu der Lösung von 1.26 g (2 mMol) Boc-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-OH, 0.44 g (2.2 mMol) H-L-Met-OMe.HCl, 0.27 g (2 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.277 ml N-Ethylmorpholin in 40 ml DMF gibt man nach Abkühlung auf -10°C die vorgekühlte Lösung von 0.412 g (2 mMol) DCC in DMF. Nach 2 Stunden rührt man 12 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wird der Dicyclohexylharnstoff in der Kälte abfiltriert und das Peptid mit Wasser gefällt. Der Niederschlag wird zweimal mit Ether gewaschen. Das Produkt fällt dünnschichtchromatographisch rein an.

Ausbeute: 1.05 g (68 %)

Fp.: 155-158°C

Rf_A: 0.60, Rf_D: 0.73

$[\alpha]_D^{20}$: +7.8°, c=0.9, MeOH)

$C_{40}H_{51}N_5O_9S$ (777.938) Ber: C 61.76 H 6.60 N 9.00 S 4.11

Gef: C 61.14 H 6.55 N 9.03 S 4.28

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH)

0.6 g (0.77 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe werden in 15 ml Methanol und 5 ml Wasser gelöst und mit 0.8 ml (0.8 mMol) 1N Kalilauge versetzt. Nach zehn Stunden Reaktionszeit wird die Verseifung abgebrochen. Der nicht umgesetzte Methylester wird durch Extraktion mit Ether aus dem alkalischen Milieu entfernt, nachdem zuvor mit 80 ml Wasser verdünnt worden ist. Danach wird mit der gleichen Menge 1N Salzsäure (0.8 mMol) neutralisiert und das Lösungsmittel abdestilliert. Es bleibt ein zähflüssiges Öl zurück. Dieses wird im Hochvakuum über Phosphorpentoxid 12 Stunden getrocknet. Dann fällt man das Produkt aus einer Methanollösung mit Ether aus. Umkristallisiert wird mit der gleichen Lösungsmittelkombination.

Ausbeute: 358 mg (61 %)

Fp.: 175°C

Rf_A: 0.52, Rf_D: 0.36

$[\alpha]_D^{20}$: -12.1° (c=1,DMF)

$C_{39}H_{49}N_5O_9S$ (763.907) Ber: C 61.32 H 6.46 N 9.16 S 4.19

Gef: C 60.78 H 6.04 N 8.65 S 5.09

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH) (Metionin-Enkephalin)

Zu 152.7 mg (0.2 mMol) des beidseitig geschützten Pentapeptids Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH, 1.1 ml (10 mMol) Anisol und 0.15 ml (2 mMol) Mercaptoethanol kondensiert man bei -5°C 15 ml Fluorwasserstoff, vorge-

trocknet über Kobalttrifluorid, und rührt 25 Minuten bei dieser Temperatur. Danach wird unter Kühlung der Fluorwasserstoff rasch mit Reinststickstoff verblasen. Der Rückstand wird sofort im Hochvakuum über pulverisiertem Kaliumhydroxid 24 Stunden lang getrocknet. Den Rückstand nimmt man in Wasser auf, extrahiert die Wasserphase dreimal mit Ether und lyophilisiert die wässrige Lösung. Das gefriergetrocknete Peptid wird in wenig Methanol gelöst und an Sephadex LH 20 Gel chromatographiert. Nach Abziehen des Methanols von der Hauptfraktion wird erneut die wäßrige Lösung lyophilisiert. Man erhält ein sehr reines Endprodukt.

Ausbeute: 18.3 mg (16 %)

Fp.: 195°C

Rf_A: 0.53, Rf_D: 0.31

$[\alpha]_D^{20}$: +31° (c=1,0, MeOH)

$C_{27}H_{35}N_5O_7S$ (573.669) Ber: C 56.53 H 6.15 N 12.21 S 5.59

Gef: C 56.68 H 5.85 N 12.34 S 5.31

Aminosäurenanalyse:		Phe	Tyr	Gly
(bezogen auf Phe)	Ber:	1.0	1.0	2.0
	Gef:	1.0	0.86	2.18

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe)

Man löst 2.53 g (4 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-OH und 0.72 g (4 mMol) L-Leu-OMe.HCl in 100 ml Dimethylformamid und kühlt auf -5°C ab. Wenn diese Temperatur er-

reicht ist, fügt man 0.54 g (4 mMol) HOBt und 0.456 ml (4 mMol) N-Ethylmorpholin dazu. Nach zehn Minuten gießt man zu dem Reaktionsgemisch eine Lösung von (4 mMol) DCC, in -5°C kaltem DMF. Nach zweistündigem Rühren bei -5°C und 12-stündigem Rühren bei Raumtemperatur wird der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und zweimal mit eiskaltem DMF nachgewaschen, der Rückstand in Methylenchlorid aufgenommen, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 2N Citronensäurelösung gewaschen, getrocknet und eingeengt. Kristallisation erfolgt nach Zugabe von Ether. Umkristallisiert wird aus Essigester/Ether/Petrolether.

Ausbeute: 2.65 g (87 %)

Fp.: 143°C

Rf_A: 0.77, Rf_D: 0.65

$[\alpha]_D^{20}$: +7.7°, (c=0,9, MeOH)

$C_{41}H_{53}N_5O_9$ (759.901) Ber: C 64.83 H 7.03 N 9.21

Gef: C 64.21 H 7.34 N 9.24

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-benzyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

1.9 g (2.5 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe werden in 40 ml Methanol gelöst, der Lösung einige Tropfen Wasser zugesetzt und dann wird mit 2.5 ml (2.5 mMol) 1N Kalilauge verseift. Nach 5 Stunden bricht man die Reaktion ab, extrahiert nichtumgesetztes Ausgangsprodukt mit Ether und neutralisiert anschließend mit 2.5 ml (2.5 mMol) 1N Salzsäure. Die Lösung wird nun bis zur Trockene eingeengt, über Phosphorpentoxid getrocknet und das Produkt aus Etha-

nol/Ether auskristallisiert.

Ausbeute: 0.98g (53 %)

Fp.: 155°C

Rf_A: 0.63, Rf_D: 0.41

$[\alpha]_D^{20}$: +1.3, (c=1.1, MeOH)

$C_{40}N_{51}N_5O_9$ (745.874) Ber: C 54.41 H 6.89 N 9.39

Gef: C 64.22 H 6.67 N 9.38

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) (Leucin-Enkephalin)

Zu 1.5 g (2 mMol) Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH kondensiert man bei 0°C ungefähr 15 ml überKobalttrifluorid getrockneten Fluorwasserstoff. Die Lösung wird 30 Minuten bei dieser Temperatur gerührt. Danach verbläst man den Fluorwasserstoff mit Reinstickstoff bei 0°C. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgt wie auf Seite beschrieben.

Ausbeute: 155 mg (14 %)

Fp.: 203-207°C

Rf_A: 0.53, Rf_D: 0.23

$[\alpha]_D^{20}$: +32° (c=0.9, MeOH)

$C_{28}H_{37}N_5O_7$ (555.632) Ber: C 60.52 H 6.71 N 12.60

Gef: C 59.99 H 6.51 N 11.98

Aminosäurenanalyse:

	Phe	Tyr	Gly	Leu
Ber:	1.0	1.0	2.0	1.0
Gef:	1.0	0.99	1.90	0.86

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESESCHEMA 3 (s.S. 30)

N-Benzyloxycarbonyl-glycin (Z-Gly-OH)

Z-Gly-OH wird nach Referenz 105 hergestellt.

Ausbeute: 87 %

Fp.: 114-115°C , Lit. 120°C [105)]

Rf_A: 0.69, Rf_D: 0.52

$C_{10}H_{11}NO_4$ (208.193) Ber: C 57.69 H 5.32 N 6.33

Gef: C 57.62 H 5.33 N 6.33

N-Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycinmethylester (Z-Gly-Gly-OMe)

Man löst 25 g (0.2 Mol) H-Gly-OMe.HCl in 80 ml absolutem Pyridin durch kurzes Erwärmen. Zu der inzwischen wieder abgekühlten Lösung fügt man weitere 160 ml absolutes Pyridin zu und tropft dann 10 ml (114 mMol) Phosphortrichlorid, gelöst in 60 ml Pyridin, innerhalb 30 Minuten zu. Man rührt nochmals 30 Minuten lang bei Raumtemperatur, setzt dann 41.6 g (0.2 Mol) Z-Gly-OH hinzu und läßt dann 12 Stunden bei 60°C stehen. Dann wird das Pyridin im Vakuum entfernt, der Rückstand mehrere Male in Methanol aufgenommen und letzteres wieder abgezogen, um letzte Pyridinreste zu entfernen. Dann trocknet man noch 24 Stunden im Hochvakuum über Phosphorpentoxid. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen, die Wasserphase mehrere Male mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit verdünnter Salzsäure pyridinfrei gewaschen, anschließend wird

mit Natriumhydrogencarbonatlösung und dann mit Wasser ausgeschüttelt, bis dieses neutral (pH 7) zeigt. Nach Entfärben mit Aktivkohle wird im Vakuum eingeengt und mit Natriumsulfat getrocknet. Auf Zusatz von Petrolether fällt ein amorphes Produkt an, das nach längerem Stehen erhärtet.

Ausbeute: 41 g (73 %)

Fp.: 65-67°C, Lit. 63-65°C [107]

Rf_A: 0.70, Rf_D: 0.58

$C_{13}H_{16}N_2O_5$ (280.280) Ber: 55.71 H 5.75 N 10.00

Gef: 55.43 H 5.81 N 9.67

Glycinmethylester.Hydrochlorid (H-Gly-OMe.HCl)

H-Gly-OMe.HCl wird nach Zitat 106 hergestellt.

Ausbeute: 92 %

Fp.: 182-184°C , Lit. 175°C [103]

Rf_A: 0.59, Rf_D: 0.25

$C_3H_8NO_2Cl$ (125.559) Ber: C 28.69 H 6.42 N 11.15 Cl 28.23

Gef: C 28.88 H 6.57 N 11.15 Cl 27.13

Glycyl-glycinmethylester.Hydrochlorid (H-Gly-Gly-OMe.HCl)

Die Lösung von 14 g (50 mMol) Z-Gly-Gly-OMe in 70 ml Methanol und 30 ml Wasser wird 5 Minuten lang mit Stickstoff gespült, dann wird unter Stickstoffatmosphäre mit 1.4 g (10 Gew.%) Pd/Aktivkohle versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Wasserstoff (reinst) hydriert. Dabei wird der pH-Wert dauernd auf 4 gehalten. Man filtriert die Aktivkohle mit Celite ab und engt am Rota-

tionsverdampfer zur Trockene ein, bis kein Salzsäuregeruch mehr wahrnehmbar ist. Den ölig-kristallinen Rückstand trocknet man über pulverisiertem Kaliumhydroxid.

Ausbeute: 8 g (87,5 %)

Fp.: 129°C

Rf_A: 0.12, Rf_D: 0.15

$C_5H_{11}N_2O_3Cl$ (182.607) Ber: C 32.88 H 6.07 N 15.34 Cl 19.41

Gef: C 32.92 H 6.18 N 15.13 Cl 19.47

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosin (Boc-L-Tyr-OH)

Boc-L-Tyr-OH wird nach einer modifizierten Vorschrift von Zitat 96) hergestellt. Man suspendiert 90.6 g (0.5 Mol) Tyrosin in 700 ml DMSO und versetzt mit 136 g (0.7 Mol) tert.-Butyl-phenylcarbonat. Dazu gibt man portionsweise 80.6 g bzw. 87,6 ml (0.7 Mol) Tetramethylguanidin und läßt 2 Tage reagieren.Danach wird die Temperatur auf 40°C erhöht und die Reaktionsmischung nochmals 24 Stunden gerührt. Bei dem stark alkalischen pH-Wert extrahiert man die Lösung zweimal mit Ether, stellt das Reaktionsgemisch auf pH 7 ein, verdünnt mit 200 ml Wasser und entfernt den größten Teil des Phenols durch Ausschütteln mit Ether. Das Produkt wird dann bei pH 2 aus dem DMSO/Wasser-Gemisch mit Essigester extrahiert. Die organische Phase wird mit Natriumhydrogencarbonat/Sodalösung (pH 9) ausgeschüttelt. Dabei geht das Produkt in die Wasserphase und das restliche Phenol bleibt in der organischen Phase. Die vereinigten Wasserphasen werden

mit der gleichen Menge Essigester überschichtet und unter starkem Rühren wird der pH-Wert auf 2 gestellt. Die Wasserphase wird noch dreimal mit Essigester extrahiert, danach wäscht man die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Kochsalzlösung neutral, trocknet über Natriumsulfat und engt auf die Hälfte des Volumens ein. Nach Zugabe von Petrolether fällt das Produkt im Kühlschrank kristallin an.

Ausbeute: 95.6 g (68%)

Fp.: 134-136°C, Lit. 136-138°C [96]

Rf_A: 0.75, Rf_D: 0.38

$[\alpha]_D^{20}$ = +5° ± 1° (c=2, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +3.9° (c=2, HAc) [96]

$C_{14}H_{19}NO_5$ (281.308) Ber: 59.78 H 6.81 N 4.98

Gef: 59.60 H 6.61 N 4.70

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycinmethylester (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OMe)

13.5 g (0.1 Mol) N-Hydroxybenzotriazol und 20.6 g (0.1 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid werden zu einer gekühlten Lösung von trockenem Dimethylformamid gegeben, die äquimolare Mengen der zu kuppelnden Komponenten enthält, nämlich 28.1 g (0.1 Mol) Boc-L-Tyr-OH und 18.3 g (0.1 Mol) H-Gly-Gly-OMe.HCl, sowie 10.1 g (0.1 Mol) N-Methylmorpholin. Es wird noch 2 Stunden bei -5°C und dann 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff filtriert man ab, destilliert das DMF ab und nimmt den Rückstand in Essigester auf.

Die organische Phase wird nacheinander je dreimal mit 5%iger $NaHCO_3$-Lösung, 2N Citronensäurelösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat dampft man bis zur Trockene ein. Diesen Rückstand löst man in Essigester, filtriert von ungelösten Beiprodukten ab und gibt etwa die gleiche Menge Petrolether (30/50) zu. Im Kühlschrank kristallisiert das Produkt aus.

Ausbeute : 31.5 g (77 %)

Fp.: 152-156°C

Rf_A: 0.83, Rf_D: 0.50

$[\alpha]_D^{20}$: +15.1° (c=1,05, MeOH)

$C_{19}H_{27}N_3O_7$ (409.439) Ber: C 55.73 H 6.67 N 10.26

Gef: C 55.56 H 6.52 N 9.86

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OH)

20.5 g (0.05 Mol) des Tripeptidesters Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OMe werden in 300 ml Methanol/Wasser-Gemisch (6:4) gelöst und mit 25 ml (0.05 Mol) 2N KOH verseift. Die Reaktion wird mittels Dünnschichtchromatographie verfolgt. Nach ca. 2 Stunden ist die Reaktion beendet. Aus der Reaktionslösung destilliert man das Methanol ab, filtriert die Lösung und stellt mit 1N Salzsäure auf pH 3 ein. Die Wasserphase extrahiert man mehrere Male mit Essigester. Aus den vereinigten und über Natriumsulfat getrockneten organischen Phasen fällt man die freie Säure mit Petrolether (30/50).

Ausbeute: 16.07 g (81.3 %)

Fp.: 110-118° (Sintern)

Rf_A: 0.62, Rf_D: 0.30

$[\alpha]_D^{20}$: +9.9° (c=1.09, MeOH)

$C_{18}H_{25}N_3O_7$ (395.412) Ber: C 54.67 H 13.00 N 10.62

Gef: C 54.13 H 12.96 N 10.34

N-Phthaloyl-L-methionin (Pht-L-Met-OH)

Pht-L-Met-OH wird nach Zitat 108 hergestellt.

Ausbeute: 80 %

Fp.: 122-125°C, Lit. 124°C [108]

Rf_A: 0.76, Rf_D: 0.48

$[\alpha]_D^{20}$: -74.6° (c=4,7, DMF), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -75.5° (c=4,7, DMF [108])

$C_{13}H_{13}NO_4S$ (279.703) Ber: C 55.90 H 4.69 N 5.01 S 11.48

Gef: C 56.30 H 4.69 N 5.08 S 11.43

N-Phthaloyl-L-methionin-tert.-butylester (Pht-L-Met-OBu^t)

Pht-L-Met-OBu^t wird synthetisiert in Anlehnung an Zitat 87

Man löst 28 g (0.1 Mol) Pht-L-Met-OH in 100 ml wasserfreiem Pyridin, gibt dazu 250 ml trockenen tert.-Butylalkohol und kühlt die Mischung auf -5°C ab. Dazu tropft man unter starkem Rühren 11 ml (0.12 Mol) Phosphoroxychlorid. Nach beendeter Zugabe rührt man noch 15 Minuten bei -5°C und 3 Stunden bei Raumtemperatur. Man gibt jetzt zu dem Reaktionsansatz je 300 ml Wasser und Essigester, trennt die Essigesterphase ab und wäscht sie so lange mit 1N Salzsäure, bis der Pyridingeruch verschwunden ist. An-

schließend wird mit wenig 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser die organische Phase neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die Essigesterphase eingeengt und mit wenig Petrolether versetzt, bis die Lösung leicht trüb wird. Im Kühlschrank fällt das gewünschte Produkt aus.

Ausbeute: 27.84 % (83.5%)

Fp.: 79-81°C, Lit. 41-42°C [109)]

Rf_A: 0.82, Rf_D: 0.83

$[\alpha]_D^{20}$: +1.2° (c=1.0, DMF), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -22.9° (c=1,MeOH)

$C_{17}H_{21}NO_4S$ (335.424) Ber: C 60.87 H 6.31 N 4.18 S 9.56

Gef: C 60.71 H 6.20 N 4.06 S 9.43

L-Methionin-tert.-butylester.Acetat (H-L-Met-OBu^t.HAc)

16.8 g (0.05 Mol) Pht-L-Met-OBu^t in 200 ml Methanol werden mit 6 ml (0.3 Mol) Essigsäure und 5 g (0.1 Mol) Hydrazinhydrat versetzt. Unter kräftigem Rühren wird die Reaktionsmischung 5 Stunden auf 45°C erwärmt und danach über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anderntags filtriert man von ausgefallenem Phthalhydrazid ab und dampft das Filtrat im Vakuum ein. Das zurückbleibende Öl erstarrt nach 2 Tagen zu einer gelblichen wachsartigen Masse. Diese löst man in Natriumcarbonatlösung auf und überschichtet die Lösung mit Ether. Die Etherphase trennt man ab und engt zur Trockene ein. Nachdem der Rückstand in Ethanol gelöst worden ist, wird vorsichtig mit Essigsäure versetzt. Dabei fällt das Acetat des tert.-Butylesters DC-rein als hochviskoses Öl an, das nach einiger

Zeit zu einer harten Masse erstarrt.

Ausbeute: 10.3 g (78 %)

Fp.: 91-95°C

Rf_A: 0.59, Rf_D: 0.65

$[\alpha]_D^{20}$: +10.8° (c=0.96; MeOH)

$C_{11}H_{23}NO_4S$ (265.372) Ber: C 49.79 H 8.73 N 5.27 S 12.08

Gef: C 48.05 H 7.91 N 5.72 S 12.58

N-Phthaloyl-L-phenylalanin (Pht-L-Phe-OH)

Pht-L-Phe-OH wird nach Zitat 110 hergestellt.

Ausbeute: 85 %

Fp.: 180-184°C, Lit. 183-185°C [110]

Rf_A: 0.72, Rf_D: 0.46

$[\alpha]_D^{20}$: -192° (c=1, DMF), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -213° (c=1.9, EtOH) [110]

$C_{17}H_{13}NO_4$ (295.294) Ber: C 69.15 H 4.43 N 4.74

Gef: C 69.68 H 4.41 N 4.72

N-Phthaloyl-L-phenylalanyl-L-methionin-tert.-butylester (Pht-L-Phe-L-Met-OBu^t)

Man löst 16.25 g (55 mMol) Pht-L-Phe-OH in 150 ml Tetrahydrofuran, kühlt auf -15°C ab und gibt dazu 6.3 g (55 mMol) N-Ethylmorpholin. Wenn die Reaktionslösung wieder -15°C erreicht hat, pipettiert man 7.5 g (55 mMol) Chlorameisensäureisobutylester zu. Nach ca. 15 sec. bildet sich ein weißer Niederschlag. Man rührt noch weitere 15 Minuten bei dieser Temperatur. Währenddessen werden 14.6g (55 mMol) der carboxy-geschützten Komponente H-L-Met-OBu^t. HAc in THF suspendiert und mit 5.55 g (55 mMol) Triethyl-

amin neutralisiert. Das dabei ausfallende Triethylammoniumacetat wird mit Wasser in Lösung gebracht. Die Lösung II mit der carboxy-geschützten Komponente wird nun zur Lösung I gegossen und der Reaktionsansatz noch weitere 15 Minuten bei -10°C gerührt. Man entfernt das Kältebad und läßt die Reaktionstemperatur langsam auf 20°C ansteigen. Das Tetrahydrofuran wird im Vakuum entfernt, der Rückstand in Essigester aufgenommen, mit 2N Citronensäure und 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird nun so lange mit Wasser ausgeschüttelt, bis das Waschwasser neutrale Reaktion zeigt. Dann wird über Natriumsulfat getrocknet und mit wenig Petrolether versetzt. In der Kälte fällt das Produkt weiß kristallin an.

Ausbeute: 13.3 g (50 %)

Fp.: 138-140°C

Rf_A: 0.88, Rf_D: 0.71

$[\alpha]_D^{20}$: -108° (c=1.06, MeOH)

$C_{26}H_{30}N_2O_5S$ (482.601) Ber: C 64.71 H 6.27 N 5.80 S 6.64

Gef: C 65.04 H 6.50 N 5.80 S 6.50

L-Phenylalanyl-L-methionin-tert.-butylester (H-L-Phe-L-Met-OBu^t)

Die Lösung von 4.8 g (10 mMol) Pht-L-Phe-L-Met-OBu^t einer Mischung von 40 ml Methanol und 40 ml Dioxan wird mit 1.2 ml Essigsäure und 1 g (20 mMol) Hydrazinhydrat

versetzt. Man rührt 5 Stunden bei 45°C und läßt dann noch 12 Stunden stehen. Vom unlöslichen Phthalhydrazid wird abgesaugt und das Filtrat im Vakuum eingeengt. Den öligen Rückstand löst man in Ether und überschüssiger Kaliumhydrogencarbonat-Lösung. Die etherische Phase wird abgetrennt, einmal mit wenig Wasser ausgeschüttelt und über Natriumsulfat getrocknet. Auf Zugabe von Petrolether fällt das Produkt als gelbliches Öl an.

Ausbeute: 3.42 g (97.5 %)

Rf_A: 0.56, Rf_D: 0.57

$[\alpha]_D^{20}$: -0.1 (c=1.0, MeOH)

$C_{18}H_{28}N_2O_3S$ (352.497) Ber: C 61.33 H 8.00 N 7.94 S 9.09

Gef: C 60.76 H 7.84 N 7.69 S 8.71

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin-tert.-butylester (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OBu^t)

Man löst 3.95 g (0.01 Mol) Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OH und 3.5 g (0.01 Mol) L-Phe-L-Met-OBu^t in 60 ml DMF, kühlt auf -10°C ab und versetzt mit 1.35 g (0.01 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol. Nach ca.5 Minuten fügt man eine vorgekühlte Lösung von 2.1 g (0.01 Mol) DCC zu dem Reaktionsansatz. Man kuppelt über Nacht, saugt vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab und engt im Vakuum ein. Der ölige Rückstand wird in Essigester aufgenommen und wie üblich sauer und basisch gewaschen. In Essigester/Petrolether fällt das Produkt kristallin an.

Ausbeute: 4.9 g (67 %)

Fp.: 148-150°C

Rf_A: 0.81, Rf_D: 0.51

$[\alpha]_D^{20}$: -10.5° (c=1.02, MeOH)

$C_{36}H_{51}N_5O_9S$ (729.896) Ber: C 59.24 H 7.04 N 9.60 S 4.39

Gef: C 57.63 H 7.11 N 9.24 S 4.85

Aminosäurenanalyse:

	Phe	Tyr	Gly	Met
Ber:	1.0	1.0	2.0	1.0
Gef:	1.0	1.04	2.07	0.5

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH)(Methionin-Enkephalin)

Die Lösung von 4 g (5.4 mMol) Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OBu^t in 50 ml (60 mMol) 1.2N HCl/Eisessig wird bei Raumtemperatur 1 Stunde lang gerührt. Nach dieser Zeit ist sowohl die α-Amino- als auch die α-Carboxy-schutzgruppe abgespalten, wie dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden kann. Bei 20°C Badtemperatur wird das Abspaltungsreagenz am Rotationsverdampfer abgezogen. Es bleibt eine schaumige, weiße Masse zurück, die mehrere Male in Methanol aufgenommen wird, welches wieder abgedampft wird. Nach Entfernung der HCl, bewahrt man das Produkt 12 Stunden im Exsikkator über Kaliumhydroxid auf. Das Peptid wird dann an Kieselgel 60 (240 mesh Korngröße) mit Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser (Verhältnis (40:40:40:5) vorgereinigt. Die Fraktionen mit dem Hauptprodukt werden dann vereinigt, das Elutionsmittel wird abdestilliert und der Rückstand aus wäßriger

Lösung gefriergetrocknet. Erneute Säulenchromatographie an Sephadex G-10 mit Wasser/Essigsäure (9:1) als Elutionsmittel und anschließende Lyophilisation ergibt das Produkt in reiner Form.

Ausbeute: 1.54 g (47 %)

Fp.: 193°C - 199°C

Rf_A: 0.53, Rf_D: 0.33

$[\alpha]_D^{20}$: +27° (c=1, MeOH)

$C_{27}H_{35}N_5O_7$ (573.669) Ber: C 58.00 H 6.91 N 10.68

Gef: C 58.11 H 6.84 N 10.62

Aminosäurenanalyse:	Phe	Tyr	Gly	Met
Ber:	1.0	1.0	2.0	1.0
Gef:	1.0	0.92	1.90	0.4

L-Leucin-tert.-butylester.Hydrochlorid (H-L-Leu-OBu^t.HCl)

H-L-Leu-OBu^t wird nach Referenz 112 hergestellt.

Ausbeute: 94 %

Fp.: 166-168°C, Lit. 166-167°C [112)]

Rf_A: 0.63, Rf_D: 0.63

$[\alpha]_D^{20}$: + 12.2° (c=1.3, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: +12.4° (c=2, EtOH) [112)]

$C_{10}H_{22}NO_2Cl$ (223.744) Ber: C 53.68 H 9.91 N 6.26 Cl 15.84

Gef: C 53.45 H 9.81 N 6.09 Cl 14.99

N-Phthaloyl-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (Pht-L-Phe-L-Leu-OBu^t)

8.85 g (0.030 Mol) Pht-L-Phe-OH und 6.7 g (0.03 Mol)

H-L-Leu-OBu^t.HCl werden in 100 ml Dimethylformamid gelöst, mit 4.05 g (0.03 Mol) 1-Hydroxybenzotriazol und 3.45 g (0.03 Mol) N-Ethylmorpholin versetzt und auf -5°C gekühlt. Nach ca.10 Minuten fügt man 6.18 g (0.03 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst und vorgekühlt in wenig DMF, hinzu und läßt eine Stunde in der Kälte und anschließend 12 Stunden bei Raumtemperatur rühren. Bei 0°C wird der Dicyclohexylharnstoff abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das zurückbleibende Öl nimmt man in Essigester auf, wäscht mit Natriumbicarbonatlösung, 2N Citronensäure und Wasser und trocknet dann über Natriumsulfat. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels erhält man eine hochviskose Masse, die nicht kristallin erhalten werden kann.

Ausbeute: 10.6 g (76.1 %)

Rf_A: 0.80, Rf_D: 0.73

$[\alpha]_D^{20}$: -106.1°,(c=7.99, MeOH)

$C_{27}H_{32}N_2O_5$ (464.562) Ber: C 69.80 H 6.94 N 6.03

Gef: C 70.37 H 7.17 N 6.11

L-Phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester(H-L-Phe-L-Leu-OBu^t)

6.0 g (13 mMol) Pht-L-Phe-L-Leu-OBu^t werden in 50 ml Ethanol zusammen mit 0.8 ml (16 mMol) Hydrazinhydrat gelöst und eine Stunde bei 80°C unter Rückfluß gekocht. Nach etwa zwanzig Minuten setzt die Kristallisation ein. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert.

Der Rückstand wird bei 0°C mit 20 ml 5N Essigsäure versetzt und kräftig geschüttelt, zwei Stunden auf 0°C gehalten und anschließend abgesaugt. Das Filtrat wird unter Kühlung mit 4N Natronlauge auf pH 8.5 gebracht und dreimal mit Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wäscht man dreimal mit gesättigter Natriumchloridlösung und trocknet über Natriumsulfat. Nach Zusatz von Petrolether fällt das Produkt aus.

Ausbeute: 3.66 g (84.3 %)

Fp.: 109-114°C

Rf_A: 0.47, Rf_D: 0.63

$[\alpha]_D^{20}$: -23.0, (c=1.0, MeOH)

$C_{19}H_{30}N_2O_3$ (334.460) Ber: C 68.23 H 9.04 N 8.38

Gef: C 68.49 H 9.51 N 8.27

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBu^t)

Die Lösung von 3.95 g (0.01 Mol) Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OH in 80 ml Dimethylformamid wird auf -15°C abgekühlt und nacheinander mit 3.35 g (0.01 Mol) L-Phe-L-Leu-OBu^t, 1.35 g (0.01 Mol) HOBt und einer vorgekühlten Lösung von 2.1 g (0.01 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid in DMF versetzt. Nach Kuppeln über Nacht wird anderntags vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, mit eiskaltem DMF nachgewaschen und das Filtrat bis zum gelblichen Öl eingeengt. Dieses wird in Essigester aufgenommen, die Lösung je dreimal basisch, sauer und neu-

tral gewaschen und überNatriumsulfat getrocknet. Auf Zusatz von Petrolether (30/50) fällt das Produkt nach einigen Tagen kristallin an.

Ausbeute: 4.1 g (57.6 %)

Fp.: 157-160°C

Rf_A: 0.78, Rf_D: 0.54

$[\alpha]_D^{20}$: -11.15 (c=1.01, MeOH)

$C_{37}H_{53}N_5O_9$ (711.857) Ber: C 62.43 H 7.50 N 9.84

Gef: C 61.98 H 7.92 N 9.55

Aminosäurenanalyse:	Leu	Phe	Tyr	Gly
Ber:	1.0	1.0	1.0	2.0
Gef:	1.0	0.95	1.05	1.8

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) (Leucin-Enkephalin)

2 g (2.8 mMol) des beidseitig geschützten Pentapeptids Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBu^t werden bei Raumtemperatur in 25 ml (30 mMol) 1.2N HCl/Eisessig eine Stunde gerührt. Danach wird das Abspaltungsreagenz am Rotverdampfer entfernt, der Rückstand mehrere Male mit Methanol versetzt und wieder abdestilliert. Der schaumige Rückstand wird im Hochvakuum über KOH 12 Stunden getrocknet, in Wasser gelöst, filtriert und lyophilisiert. Chromatographie über Kieselgel 60 (240-300 mesh Korngröße) mit Methanol/Chloroform/Benzol/Wasser (Verhältnis 4:4:4:0.5, v,v) liefert eine Hauptfraktion, aus der nach erneutem Lyophilisieren das Produkt als weißes Pulver erhalten wird.

Ausbeute: 880 mg (53 %)

Fp.: 165-167°C

Rf_A: 0.51, Rf_D: 0.25

$[\alpha]_D^{20}$: +29.7° (c=1.0, MeOH)

$C_{28}H_{38}N_5O_7Cl$ (592.093) Ber: C 56.80 H 6.46 N 11.83 Cl 5.99

Gef: C 55.90 H 6.31 N 11.18 Cl 5.53

Aminosäurenanalyse:

	Gly	Phe	Tyr	Leu
Ber:	2.0	1.0	1.0	1.0
Gef:	2.10	1.02	1.02	1.09

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESE-SCHEMA 4 (s.S. 36)

N-Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (Z-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBu^t)

Man löst 4.0 g (15 mMol) Z-Gly-Gly-OH in 80 ml abs. DMF und kühlt auf -15°C ab. Dazu gibt man nacheinander 5.0 g (15 mMol) H-L-Phe-L-Leu-OBu^t, 2.02 g (15 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol, 3.1 g (15 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid. Man rührt noch 1 Stunde bei -15°C und 12 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand in Essigester aufgenommen, dreimal mit jeweils 150 ml 2N Citronensäurelösung, 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird auf etwa die Hälfte des Volumens eingeengt und vorsichtig mit Petrolether versetzt. Im Kühlschrank kristallisiert das Produkt aus dieser Lösungsmittelkombination aus.

Ausbeute: 5.9 g (67.7 %)

Fp.: 114-117°C

Rf_A: 0.81, Rf_D: 0.67

$[\alpha]_D^{20}$: -13.5° (c=1.03; MeOH)

$C_{31}H_{42}N_4O_7$ (582.698) Ber: C 63.90 H 7.27 N 9.62

Gef: C 63.78 H 7.37 N 9.80

Glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butyl-ester (H-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBu^t)

2.7 g (4.6 mMol) des geschützten Tetrapeptids werden in 50 ml Methanol gelöst. Dazu gibt man einige Tropfen Wasser und 0.5 g Pd/Aktivkohle (10%). Während der Hydrierung wird der pH-Wert mit einer 5N HCl/Dioxanlösung auf 5 gehalten. Nach ca.einer Stunde ist die Reaktion beendet. Man filtriert die Aktivkohle über Celite ab und engt das Filtrat ein. Um die letzten Spuren von Wasser zu entfernen, wird der Rückstand mehrere Male mit Dioxan versetzt und eingeengt. Nach Trocknen am Hochvakuum über pulverisierter KOH erhält man ein leicht gelbes Produkt, das chromatographisch rein und sehr hygroskopisch ist.

Ausbeute: 1.95 g (94.4 %)

Fp.: 100-115°C; Zersetzung bei 135°C

Rf_A: 0.47, Rf_D: 0.3

$[\alpha]_D^{20}$: -16.8° (c=2.38; MeOH)

$C_{23}H_{37}N_4O_5Cl$ (485.075) Ber: C 56.96 H 7.69 N 11.55 Cl 7.31

Gef: C 55.83 H 7.78 N 5.73 Cl 6.34

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosylhydrazid (Boc-L-Tyr-N_2H_3)

Boc-L-Tyr-N_2H_3 wird nach Referenz 117 hergestellt.

Ausbeute: 89.4 %

Fp.: 187-191°C, Lit: 191-193°C [117]

Rf_A: 0.51, Rf_D: 0.62

$[\alpha]_D^{25}$: +8.5 (c=1,0, DMF), Lit: $[\alpha]_D^{25}$: +8.8° (c=1.0,DMF) [117]

$C_{14}H_{21}N_3O_4$ (295.339) Ber: C 56.94 H 7.17 N 14.23

Gef: C 56.69 H 7.51 N 14.77

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin-tert.-butylester (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBu^t)

1.18 g (4 mMol) Boc-L-Tyr-N_2H_3 löst man in 20 ml DMF und versetzt bei -30°C mit 4.4 ml (8 mMol) 1.8 N HCl/THF und 0.64 (4.8 mMol) Isoamylnitrit. Nach 15 Minuten ist der Hydrazidtest negativ. Es wird noch 10 Minuten weitergerührt und die Reaktion durch Zugabe von 1.11 ml (8 mMol) Triethylamin neutralisiert. Dazu gibt man 1.8 g (4 mMol) H-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBu^t, in wenig DMF gelöst, rührt noch 2 Stunden bei -30°C und 24 Stunden bei 0°C. Nach Entfernen des Lösungsmittels im Vakuum wird in Essigester aufgenommen, mit 2N Citronensäurelösung und gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Nach Einengen fällt das Produkt ölig an. Im Hochvakuum erstarrt es dann zu einer leicht gelben, blasigen Masse.

Ausbeute: 2.2 g (79.3 %)

Fp.: ab 120°C Sintern, 153°C-162°C Schmelzintervall

Rf_A: 0.77, Rf_D: 0.47

$[\alpha]_D^{27}$: -12.4° (c=1.1, MeOH)

$C_{37}H_{53}N_5O_9$ (711.857) Ber: C 62.43 H 7.50 N 9.84

Gef: C 62.77 H 7.79 N 9.51

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) (Leucin-Enkephalin)

Unter Stickstoffatmosphäre übergießt man 1.4 g (2 mMol) des beidseitig geschützten Pentapeptids mit 40 ml eiskalter konzentrierter Salzsäure. Nach achtminütigem Rühren bei 0°C wird die Salzsäure am Rotationsverdampfer rasch abgezogen. Nach mehrmaliger Extraktion mit Methanol wird in Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Material zeigt in zwei verschiedenen Fließmittelsystmen nur geringe Verunreinigungen. Man reinigt auf einer Kieselgel 60-Säule mit Methanol/Benzol/Chloroform/Wasser (40:40:40:5). Die in Frage kommenden Fraktionen werden vereinigt, die Lösungsmittel abgezogen und erneut gefriergetrocknet.

Ausbeute: 932 mg (76.4 %)

Fp.: 206-210°C

Rf_A: 0.58, Rf_D: 0.19

$[\alpha]_D^{23}$: +29.9° (c=1.0, MeOH)

$C_{28}H_{38}N_5O_7Cl$ (555.632) Ber: C 55.12 H 6.60 N 11.47 Cl 5.8

Gef: C 53.94 H 6.28 N 10.93 Cl 6.87

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESE-SCHEMA 5 (s.S. 37)

N-tert.-Butyloxycarbonylglycin (Boc-Gly-OH)

Boc-Gly-OH wird nach Zitat 96 hergestellt (vgl.S. 84)

N-tert.-Butyloxycarbonylglycin-N-hydroxysuccinimid-ester (Boc-Gly-OSu)

Boc-Gly-OSu wird dargestellt, wie in Referenz 111 angegeben.

Ausbeute: 77 %

Fp.: 167-169°C, Lit. 168-170°C

Rf_A: 0.71, Rf_D: 0.63

$C_{11}H_{16}N_2O_6$ (272.257) Ber: C 48.52 H 5.92 N 10.29

Gef: C 48.87 H 6.06 N 10.39

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-glycin (Boc-Gly-Gly-OH)

3 g (0.04 Mol) H-Gly-OH und 4.24 g (0.04 Mol) Natriumcarbonat (wasserfrei) werden in 100 ml Wasser gelöst und zu 9.53 g (0.035 Mol) Boc-Gly-OSu,gelöst in 50 ml Dimethylformamid, unter Rühren tropfenweise zugegeben. Nach vierstündigem Rühren bei Raumtemperatur wird die Lösung bis fast zur Trockene eingeengt, mit etwa 100 ml Wasser versetzt und durch Zugabe von Salzsäure auf pH 3 gebracht. Nach erneutem Einengen auf etwa die Hälfte des Volumens wird mit 100 ml gesättigter Kochsalzlösung versetzt und die Wasserphase mehrere Male mit Essigester extrahiert. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird der Essigester abgezogen und das Produkt aus Methanol/Ether gefällt.

Ausbeute: 8.8 g (95 %)

Fp.: 128-131°C

Rf_A: 0.60, Rf_D: 0.24

$C_9H_{16}N_2O_5$ (232.236) Ber: C 46.55 H 6.94 N 12.06

Gef: C 46.35 H 6.94 N 12.00

Glycyl-glycin.Hydrochlorid (H-Gly-Gly-OH.HCl)

6.96 g (0.03 Mol) Boc-Gly-Gly-OH werden in 250 ml (0.3 Mol) 4.7 N HCl/Dioxan gelöst und 30 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Danach wird im Vakuum zur Trokkene eingeengt. Den zurückbleibenden weißen Schaum extrahiert man dreimal mit Methanol. Aus Methanol/Ether kristallisiert ein feines Pulver aus.

Ausbeute: 3.6 g (91 %)

Fp.: Zersetzung ab 215°C

Rf_A: 0.1, Rf_D: 0.02

$C_4H_9N_2O_5$ (168.580) Ber: C 28.50 H 5.38 N 16.62 Cl 21.03

Gef: C 26.73 H 5.68 N 14.95 Cl 21.69

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin (Boc-L-Phe-OH)

Die Substanz Boc-L-Phe-OH wurde vom Ansatz Seite 73 genommen.

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanin-N-hydroxy-succinimidester (Boc-L-Phe-OSu)

Boc-L-Phe-OSu wird nach Zitat 114 dargestellt.

Ausbeute: 77 %

Fp.: 151°C, Lit. 152-153°C [114)]

Rf_A: 0.72, Rf_D: 0.60

$[\alpha]_D^{20}$: -20° (c=1.0, Dioxan)

$C_{18}H_{22}N_2O_6$ (362.382) Ber: C 59.66 H 6.12 N 7.73

Gef: C 59.26 H 6.38 N 6.99

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-methionin (Boc-L-Phe-L-Met-OH)

Boc-L-Phe-L-Met-OH wird synthetisiert wie in Referenz 115 angegeben.

Ausbeute: 69 %

Fp.: 145-149°C, Lit. 138-140°C

Rf_A: 0.76, Rf_D: 0.44

$[\alpha]_D^{20}$: -8° ± 1° (c=1.0, DMF, Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -9.8 (c=1.0.DMF)[115])

$C_{19}H_{28}N_2O_5S$ (396.506) Ber: C 57.55 H 7.11 N 7.06 S 8.08

Gef: C 57.36 H 7.22 N 6.82 S 8.07

L-Phenylalanyl-L-methionin.Hydrochlorid (H-L-Phe-L-Met-OH.HCl)

Die Boc-Abspaltung von Boc-L-Phe-L-Met-OH erfolgt ebenfalls wie in Referenz 115 beschrieben.

Ausbeute: 95 %

Fp.: 152-156°C (Braunfärbung)

Rf_A: 0.56, Rf_D: 0.27 (Zersetzung auf der Platte)

$[\alpha]_D^{20}$: +19.1° (c = 0.99, MeOH)

$C_{14}H_{21}N_2O_3SCl$ (332.850) Ber:C 50.52 H 6.36 N 8.42 S 9.63 Cl 10.6

Gef:C 50.04 H 6.52 N 7.84 S 9.09 Cl 9.6

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosin (Boc-L-Tyr-OH)

Boc-L-Tyr-OH wird über H-L-Tyr-OMe.HCl [106], H-L-Tyr-OMe [116], Boc-L-Tyr-OMe [117] und anschließender Verseifung des Methylesters hergestellt.

Ausbeute: (bezogen auf Tyrosin) 57.5 %

Fp.: 133-134°C

Rf_A: 0.73, Rf_D: 0.40

α_D^{20}: +3.5° (c=2, HAc)

$C_{14}H_{19}NO_5$ (281.308) Ber: C 59.78 H 6.81 N 4.98

Gef: C 59.55 H 6.65 N 4.73

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosin-N-hydroxysuccinimid-ester (Boc-L-Tyr-OSu)

Boc-L-Tyr-OSu wird nach der Referenz 118 hergestellt.

Ausbeute: 76.5 %

Fp.: 182-184°C, Lit. 192-193°C[118], Lit. 180-182°C[119]

Rf_A: 0.77, Rf_D: 0.49 (Zersetzung)

$[\alpha]_D^{20}$: -29.5° (c=1.0, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -43.3° (c=1,0,DMF)[118]

$C_{18}H_{22}N_2O_7$ (378.381) Ber: C 57.13 H 5.86 N 7.40

Gef: C 56.96 H 5.64 N 7.10

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OH)

Zu der Lösung von 30.3 g (180 mMol) H-Gly-Gly-OH.HCl in 180 ml (360 mMol) 2N Natronlauge gibt man unter starkem Rühren 30 g (357 mMol) Natriumhydrogencarbonat. Dazu tropft man langsam unter Eiskühlung die Lösung von 56.7g

(150 mMol) Boc-L-Tyr-OSu in Dimethylformamid. Um eine homogene Lösung zu erhalten, gibt man zu dem Reaktionsgemisch noch etwa 100 ml Wasser. Danach rührt man 24 Stunden bei Raumtemperatur, dampft bis zur Trockene ein und nimmt den Rückstand in einem Essigester/Wasser-Gemisch (1:1) auf. Mit verdünnter Schwefelsäure wird der pH-Wert auf 3 gebracht, die Essigesterphase abgetrennt und die saure,wässrige Phase noch dreimal mit 100 ml Essigester extrahiert.Die vereinigten organischen Extrakte werden mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Umkristallisiert wird aus Ethanol/Wasser.

Ausbeute: 43.9 g (74 %)

Fp.: 112-117°C, Sintert ab 90°C

Rf_A: 0.60, Rf_D: 0.21

$[\alpha]_D^{20}$: +10.1° (c=1.0, MeOH)

$C_{18}H_{25}N_3O_7$ (395.412) Ber: C 54.67 H 13.00 N 10.62

Gef: C 54.91 H 12.79 N 10.99

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycin-N-hydroxysuccinimidester (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OSu)

Man löst 9.9 g (25 mMol) Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OH und 3.45 g (30 mMol) N-Hydroxysuccinimid in 80 ml trockenem 1.2-Dimethoxyethan und kühlt unter Rühren auf -10°C ab. Bei dieser Temperatur tropft man 6.2 g (30 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 30 ml 1.2-Dimethoxyethan, innerhalb 20 Minuten zu. Man beläßt den Reak-

tionsansatz noch eine Stunde bei dieser Temperatur und danach noch 15 Minuten bei Zimmertemperatur. Man kühlt dann wiederum auf -10°C ab, filtriert den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, wäscht mit wenig eiskaltem 1.2-Dimethoxyethan nach und engt das Filtrat bis zur Trockene ein. Man erhält einen sandfarbenen Schaum, der ohne weitere Reinigung und Charakterisierung umgesetzt wird.

Ausbeute: 13 g (105 %)

$C_{22}H_{28}N_4O_9$ (492.485)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH)

Die Lösung von 7.32 g (22 mMol) L-Phe-L-Met-OH.HCl in 50 ml absolutem Dimethylformamid wird mit einer Lösung von 4.45 g (44 mMol) N-Methylmorpholin in 30 ml DMF versetzt. Anschließend tropft man 10.8 g (22 mMol) Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OSu, gelöst in 50 ml Dimethylformamid, innerhalb 30 Minuten bei Raumtemperatur zu. Nach 18 Stunden Reaktionszeit wird das Gemisch eingeengt, der Rückstand in Essigester und 10%iger Citronensäurelösung aufgenommen, die organische Phase abgetrennt und die Wasserphase noch dreimal mit je 40 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Essigesterlösungen wäscht man zweimal mit gesättigter Kochsalzlösung und trocknet über Natriumsulfat. Nach Abziehen des Lösungsmittels erhält man ein hochviskoses,gelbes Öl, das nach einigen Tagen

durchkristallisiert.

Ausbeute: 10.8 g (73 %)

Fp.: 147-151°C, Lit: 150-152°C [119]

Rf_A: 0.61, Rf_D: 0.25

$[\alpha]_D^{20}$: +18.1 (c=1.1, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +18.7° (c=0.80, MeOH) [119]

$C_{32}H_{43}N_5O_9S$ (673.786) Ber: C 57.04 H 6.43 N 10.39 S 4.76

Gef: C 57.23 H 6.51 N 10.14 S 4.08

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH) (Methionin-Enkephalin)

6.7 g (10 mMol) des obigen,beidseitig geschützten Pentapeptids löst man in peroxidfreiem Dioxan (150 ml). Dazu gibt man 120 ml 4.75 N HCl in peroxidfreiem Dioxan (570 mMol) und rührt bei Raumtemperatur etwa eine Stunde. Mittels Dünnschichtchromatographie kann kein Ausgangsprodukt mehr festgestellt werden. Die Reaktionslösung wird bis zur Trockene eingeengt. Das viskose Öl wird zweimal mit Ether übergossen, gerührt und anschließend wieder dekantiert. Im Hochvakuum erhält man ein amorphes, leicht gelbes Produkt. Dieses wird in Wasser/Essigsäure (9:1,v/v) aufgenommen und auf Sephadex G 15 mit Wasser/Essigsäure (9:1, v/v) chromatographiert. Die Hauptfraktionen werden gesammelt, mit Ammoniak neutralisiert und lyophilisiert. Das erhaltene Produkt nimmt man in Methanol/Benzol/Chloroform/Wasser (40:40:40:5) auf und chromatographiert auf Kieselgel Si 60 (240-300 mesh) mit demselben Lösungsmittelgemisch. Von der Hauptfrak-

tion zieht man das Lösungsmittel ab, nimmt in Wasser auf, filtriert unlösliche Beiprodukte ab und lyophilisiert erneut.

Ausbeute: 2.6 g (47 %)

Fp.: 160-194°C (Sintern)

Rf_A: 0.56, Rf_D: 0.34

$[\alpha]_D^{20}$: +29° (c=1.0, MeOH)

$C_{27}H_{39}N_5O_9S$ (609.699) Ber: C 53.19 H 6.45 N 11.49 S 5.25

Gef: C 53.89 H 6.34 N 10.37 S 4.73

Aminosäurenanalyse:

	Phe	Tyr	Gly	Met
Ber:	1.0	1.0	2.0	1.0
Gef:	1.0	0.9	2.0	0.6

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-L-Phe-L-Leu-OH)

Boc-L-Phe-L-Leu-OH wird analog zu Referenz 115 hergestellt.

Ausbeute: 78.5 %

Fp.: 144-146°C, Lit. 138-140°C

Rf_A: 0.77, Rf_D: 0.43; (0.51)

$[\alpha]_D^{20}$: -10.7° (c=1.1 DMF), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: -8.8° (c=1.0,DMF)[115]

$C_{20}H_{30}N_2O_5$ (378.469) Ber: C 63.47 H 7.99 N 7.40

Gef: C 63.04 H 8.08 N 7.71

L-Phenylalanyl-L-leucin.Hydrochlorid (H-L-Phe-L-Leu-OH.HCl)

Die Boc-Abspaltung von Boc-L-Phe-L-Leu-OH wird ebenfalls analog zu Zitat 115 durchgeführt.

Ausbeute: 91 %

Fp.: 142-145°C, Lit. 122-123°C

Rf_A: 0.61, Rf_D: 0.30

$[\alpha]_D^{20}$: -3.8° (c=0.9, MeOH)

$C_{15}H_{23}N_2O_3Cl$ (314.813) Ber: C 57.23 H 7.36 N 8.90 Cl 11.26

Gef: C 54.94 H 7.54 N 8.34 Cl 11.67

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

Zu der Lösung von 31.4 g (10 mMol) H-L-Phe-L-Leu-OH.HCl in 30 ml Dimethylformamid gibt man 2.78 ml (20 mMol) Triethylamin. Dazu tropft man bei Raumtemperatur 4.9 g (10 mMol) Boc-L-Tyr-Gly-Gly-OSu, gelöst in 20 ml DMF, innerhalb 15 Minuten. Nach 18 Stunden dampft man das Reaktionsgemisch bis zur Trockene ein, nimmt in Essigester auf und wäscht mit Citronensäure und Kochsalzlösung. Nach Trocknen über Natriumsulfat engt man ein und versetzt mit etwa der gleichen Menge Petrolether 30/50. Im Kühlschrank fällt das Produkt nach einigen Tagen als zähes, leicht bräunliches Öl aus, das nach Zugabe von etwas Essigester und Ether kristallisiert.

Ausbeute: 4.8 g (73.2 %)

Fp.: Sintern ab 180°C, Zersetzung bei 210°C

Rf_A: 0.67, Rf_D: 0.28

$[\alpha]_D^{20}$: -2.65 (c=1.0, MeOH)

$C_{33}H_{45}N_5O_9$ (655.749) Ber: C 60.44 H 6.92 N 10.68

Gef: C 60.11 H 7.14 N 10.43

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) (Leucin-Enkephalin)

Zu der Lösung von 3.3 g (5 mMol) des obigen geschützten Pentapeptids in peroxidfreiem Dioxan gibt man 100 ml 4.75 N HCl in Dioxan (entsprechend 475 mMol) und rührt bei Raumtemperatur eine Stunde. Der Umsatz wird durch Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand wird zur Entfernung letzter Spuren von Salzsäure mehrere Male mit Methanol extrahiert. Danach trocknet man 48 Stunden über pulverisiertem Kaliumhydroxid im Hochvakuum. Das Rohprodukt reinigt man über Kieselgel 60 (240-300 mesh) mit einem Gemisch von Benzol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5). Die vereinigten Fraktionen, die das Produkt enthalten, werden zur Trockene eingeengt, in Wasser aufgenommen, filtriert und das Filtrat lyophilisiert. Man erhält 1.3 g Leucin-Enkephalin (als Hydrochlorid).

Ausbeute: 1.3 g (41.4 %)

Fp.: 158-165°C, Lit. 150-200°C [120]

Rf_A: 0.52, Rf_D: 0.25

$[\alpha]_D^{20}$: +21.7° (c=1,MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +20.3° (c=1,MeOH) [120]

$C_{28}H_{40,5}N_5O_8Cl_{1,5}$ (628.338) Ber: C 53.52 H 6.49 N 11.14 Cl 8.46

Gef: C 49.69 H 5.95 N 10.24 Cl 8.32

Aminosäurenanalyse:

	Phe	Leu	Gly	Tyr
Ber:	1.0	1.0	2.0	1.0
Gef:	1.0	1.06	2.0	0.84

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESESCHEMA 6 (s.S.42)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-glycin-N-hydroxysuccinimidester (Boc-Gly-Gly-OSu)

Die Lösung von 23.2 g (0.1 Mol) Boc-Gly-Gly-OH in 100 ml Dimethylformamid kühlt man auf 0°C ab, gibt 11.5 g (0.1 Mol) N-Hydroxysuccinimid zu und tropft bei der gleichen Temperatur 20.6 g (0.1 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid, gelöst in 100 ml DMF, dazu. Man erwärmt das Reaktionsgemisch langsam auf Raumtemperatur und rührt noch 12 Stunden lang. Danach filtriert man vom Dicyclohexylharnstoff ab, wäscht diesen kurz mit kaltem Dimethylformamid und engt am Rotationsverdampfer ein. Umkristallisiert wird aus wenig Isopropanol.

Ausbeute: 22 g (67 %)

Fp.: 164-166°C

Rf_A: 0.56, Rf_D: 0.56

$C_{13}H_{19}N_3O_7$ (329.309) Ber: C 47.42 H 5.82 N 12.76

Gef: C 47.32 H 5.87 N 12.77

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

Man löst 6.3 g (20 mMol) H-L-Phe-L-Leu-OH.HCl in 40 ml Dimethylformamid und 5.56 ml (40 mMol) Triethylamin und tropft dazu eine Dimethylformamidlösung von 6.6 g (20 mMol) Boc-Gly-Gly-OSu. Nach zwölfstündiger Reaktionszeit engt man die Lösung ein, nimmt den Rückstand in gleichen Mengen Essigester und 10%iger Citronensäurelösung auf, trennt

die organische Phase ab und extrahiert die Wasserphase noch dreimal mit je 80 ml Essigester. Die vereinigten Essigesterphasen wäscht man mit gesättigter Kochsalzlösung und trocknet dann über Natriumsulfat.Umkristallisiert wird aus Essigester/Petrolether (30/50) unter Zugabe von wenig Diethylether.

Ausbeute: 6.9 g (70.5 %)

Fp.: 148-152°C

Rf_A: 0.77, Rf_D: 0.36

$[\alpha]_{578}^{20}$: -6.2° (c=0.993,MeOH)

$C_{24}H_{36}N_4O_7$ (492.537) Ber: C 58.52 H 7.37 N 11.37

Gef: C 57.04 H 7.30 N 10.16

Glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin.Hydrochlorid (H-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH.HCl)

Man übergießt 4.9 g (10 mMol) Boc-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH mit 100 ml (475 mMol) 4.75 N HCl/Dioxan und rührt den Reaktionsansatz bei Raumtemperatur so lange, bis dünnschichtchromatographisch kein Ausgangsprodukt mehr festzustellen ist. Das Abspaltungsreagenz wird dann am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand mehrere Male mit Methanol extrahiert. Nach Entfernung der Lösungsmittel erhält man einen leicht gelben Rückstand. Diesen nimmt man in Methanol auf und versetzt mit Ether bis zur leichten Trübung.

Ausbeute: 3.9 g (91 %)

Fp.: 217-220°C (Zersetzung)

Rf_A: 0.40, Rf_D: 0.15

$[\alpha]_{578}^{25}$: -6.7° (c=1.o, MeOH)

$C_{19}H_{29}N_4O_5Cl$ (428.917) Ber: C 53.20 H 6.81 N 13.06 Cl 8.27

Gef: C 51.92 H 6.81 N 12.73 Cl 8.21

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

Zur Lösung von 2.15 g (5 mMol) H-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH. HCl und 1.1 ml (10 mMol) N-Methylmorpholin in 50 ml Dimethylformamid tropft man 1.9 g (5 mMol) Boc-L-Tyr-OSu, gelöst in 20 ml DMF, und rührt anschließend noch 15 Stunden. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand zwischen Ethylacetat und Citronensäurelösung (jeweils 100 ml) verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wäscht man die Wasserphase dreimal mit Essigester, die vereinigten organischen Extrakte mit gesättigter Kochsalzlösung und trocknet dann über Natriumsulfat. Nach Einengen wird Petrolether (30/50) bis zur leichten Trübung dazugegeben. Im Kühlschrank kristallisiert das Produkt langsam aus (vgl. S.).

Ausbeute: 2.2 g (67.5 %)

Fp.: 176°(Zersetzung)

Rf_A: 0.64, Rf_D: 0.28

$[\alpha]_D^{20}$: -2.5 (c=1.o, MeOH)

$C_{33}H_{45}N_5O_9$ (655.749) Ber: C 60.44 H 6.92 N 10.68

Gef: C 60.22 H 7.12 N 10.52

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) (Leucin-Enkephalin)

Zu 5 mMol des obigen geschützten Pentapeptids in peroxidfreiem Dioxan gibt man 100 ml 4.75 N HCl in Dioxan (entsprechend 475 mMol) und rührt bei Raumtemperatur 1 Stunde. Der Umsatz wird durch Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand wird zur Entfernung letzter Spuren von Salzsäure mehrere Male mit Methanol extrahiert. Danach trocknet man 48 Stunden über pulverisiertem Kaliumhydroxid im Hochvakuum. Das Rohprodukt reinigt man über Kieselgel 60 (240-300 mesh) mit einem Gemisch von Benzol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5). Die vereinigten Fraktionen, die das Produkt enthalten, werden zur Trockene eingeengt, in Wasser aufgenommen, filtriert und das Filtrat lyophilisiert.

Ausbeute:

Fp.: 165-168°C

Rf_A: 0.58, Rf_D: 0.19

$[\alpha]_D^{20}$: +23.6° (c=1, MeOH)

$C_{28}H_{40}M_5O_8Cl$ (610.108) Ber: C 55.12 H 6.60 N 11.47 Cl 5.8

Gef: C 54.92 H 6.33 N 11.29 Cl 4.86

Aminosäurenanalyse:

	Gly	Phe	Tyr	Leu
Ber:	2.0	1.0	1.0	1.0
Gef:	2.0	1.04	0.90	1.07

N-tert.-Butyloxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (Boc-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH)

Man löst 5 g (15 mMol) H-L-Phe-L-Met-OH.HCl in 80 ml DMF und gibt dazu 4.17 ml (30 mMol) Triethylamin. Zu dieser Mischung tropft man die Lösung von 4.9 g (20 mMol) Boc-Gly-Gly-OSu in DMF. Nach 15stündiger Reaktionszeit engt man die Lösung ein, nimmt den Rückstand in gleichen Mengen Essigester und 10%iger Citronensäurelösung auf, trennt die organische Phase ab und extrahiert die Wasserphase noch dreimal mit je 100 ml Essigester. Die vereinigten organischen Extrakte wäscht man mit gesättigter Kochsalzlösung und trocknet über Natriumsulfat. Umkristallisiert wird aus Essigester/Petrolether (30/50).

Ausbeute: 5.2 g (68 %)

Fp.: 123-128°C

Rf_A: 0.69, Rf_D: 0.31

$[\alpha]_D^{23}$: -8.8° (c= 1.0, MeOH)

$C_{23}H_{34}N_4O_7S$ (510.610) Ber: C 54.10 H 6.71 N 10.97 S 6.28

Gef: C 53.74 H 6.65 N 10.78 S 6.53

Glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin.Hydrochlorid (H-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH.HCl)

2.55 g (5 mMol) Boc-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH werden mit 70 ml 4.75 N (330 mMol) HCl/Dioxan übergossen und 40 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Dann entfernt man das Abspaltungsreagenz am Rotationsverdampfer, extrahiert den Rückstand mehrere Male mit Methanol und

engt bis zur Trockene ein. Man erhält einen leicht gelbstichigen Rückstand.

Ausbeute: 2 g (92.5 %)

Fp.: 225°C (Zersetzung, Braunfärbung)

Rf_A: 0.28, Rf_D: 0.12

$[\alpha]_D^{20}$: -15.7° (c=0.5, MeOH)

$C_{18}H_{27}N_4O_5SCl$ (446.954 Ber: C 53.40 H 5.85 N 12.53 S 7.17 Cl 7.93

Gef: C 51.40 H 6.34 N 13.27 S 7.63 Cl 2.82

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH)

Zur Lösung von 1.8 g (4 mMol) H-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH. HCl und 1.11 ml (8 mMol) Triethylamin in 40 ml DMF tropft man 1.5 g (4 mMol) Boc-L-Tyr-OSu, gelöst in 20 ml DMF und rührt anschließend noch 15 Stunden. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand zwischen Ethylacetat und Citronensäurelösung (jeweils 100 ml) verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase wäscht man die Wasserphase 3 mal mit Essigester, die vereinigten organischen Extrakte mit gesättigter Kochsalzlösung und trocknet dann über Natriumsulfat. Nach Einengen wird mit Petrolether (30/50) bis zur leichten Trübung versetzt. Im Kühlschrank kristallisiert das Produkt aus.

Ausbeute: 1.67 g (62.2 %)

Fp.: 147-152°C, Lit. 150-152°C [119]

Rf_A: 0.59, Rf_D: 0.35

$[\alpha]_D^{20}$: +17.3°, (c=1.0, MeOH), Lit. $[\alpha]_D^{20}$: +18.7° (c=0.8, MeOH) [119]

$C_{32}H_{43}N_5O_9S$ (673.786) Ber: C 57.04 H 6.43 N 10.39 S 4.75
Gef: C 56.91 H 6.31 N 10.06 S 4.38

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OH) (Methionin-Enkephalin)

Zur Lösung von 1.35 g (2 mMol) Boc-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH in peroxidfreiem Dioxan gibt man 25 ml (118.75 mMol) 4.75 N HCl/Dioxan und rührt bei Raumtemperatur eine Stunde. Der Umsatz wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Der nach dem Abdampfen des Lösungsmittels erhaltene Rückstand wird zur Entfernung letzter Spuren von Salzsäure mehrere Male mit Methanol extrahiert. Man trocknet 48 Stunden über pulverisiertem Kaliumhydroxid im Hochvakuum. Das Rohprodukt reinigt man über Kieselgel 60 (240-300 mesh). mit Benzol/Chloroform/Methanol/Wasser (40:40:40:5). Die vereinigten Fraktionen, die das Produkt enthalten, werden zur Trockene eingeengt, in Wasser aufgenommen, filtriert und das Filtrat lyophilisiert.

Ausbeute: 625 mg (51.25 %)

Fp.: 147-158°C, Lit. 135-175°C [119]

Rf_A: 0.56, Rf_D: 0.34

$[\alpha]_D^{28}$: +29° (c=1.1, MeOH)

$C_{27}H_{35}N_5O_7S$ (573.669) Ber: C 54.78 H 6.04 N 11.83 S 5.41 Cl 2.9
(ber.mit 1/2 HCl) Gef: C 55.25 H 6.44 N 11.32 S 5.10 Cl 3.1

Aminosäurenanalyse:	Gly	Tyr	Phe	Met
Ber:	2.0	1.0	1.0	1.0
Gef:	1.92	0.92	1.0	0.82
Gef:	2.08	1.0	1.08	0.89

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESE-SCHEMA 7 (s.S. 44)

N-Benzyloxycarbonylglycin (Z-Gly-OH)

N-Benzyloxycarbonylglycin wird von dem Ansatz S.95 verwendet.

Glycinmethylester.Hydrochlorod (Gly-OMe.HCl)

Glycinmethylester.Hydrochlorid wird von dem Reaktionsansatz S. 96 genommen.

N-Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycin-methylester (Z-Gly-Gly-OMe)

Man löst 12.55 g (0.1 Mol) H-Gly-OMe.HCl, 20.8 g (0.1 Mol) Z-Gly-OH sowie 13.5 g (0.1 Mol) HOBt, 20.6 g (0.1 Mol) Dicyclohexylcarbodiimid und 11.03 ml (0.1 Mol) N-Methylmorpholin in -15°C kaltem Dimethylformamid (300 ml) und rührt noch zwei Stunden bei dieser Temperatur und weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur. Danach filtriert man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, wäscht kurz mit eiskaltem DMF nach und engt am Rotationsverdampfer ein. Das zurückbleibende, braune Öl nimmt man in Essigester auf, wäscht mit 5%iger Hydrogencarbonatlösung und 10%iger Citronensäure. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die organische Phase bis zur Trockene eingeengt, in Me-

thanol aufgenommen und mit Ether gefällt.

Ausbeute: 18.6 (66.4 %)

Fp.: 61-64°C, Lit. 63-65°C [107]

Rf_A: 0.66, Rf_D: 0.57

$C_{13}H_{16}N_2O_5$ (280.280) Ber: C 55.71 H 5.75 N 10.00

Gef: C 55.34 H 5.73 N 10.04

N-Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycin (Z-Gly-Gly-OH)

Man löst 14.01 g (0.05 Mol) Z-Gly-Gly-OMe in 100 ml Methanol, gibt einige Tropfen Wasser und unter starkem Rühren 50 ml 1N Natronlauge dazu. Die Verseifung wird dünnschichtchromatographisch verfolgt. Nach etwa einer Stunde wird die Reaktion abgebrochen, obwohl noch Spuren vom Ausgangsmaterial vorhanden sind. Die Lösung wird auf etwa die Hälfte eingeengt, mit der gleichen Menge Wasser versetzt und danach mit Ether extrahiert. Die Wasserphase wird dann mit 2N Salzsäure auf pH 2 gestellt, mit Essigester überschichtet und nach Abtrennen der organischen Phase noch dreimal mit Essigester gewaschen. Die vereinigten organischen Extrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und bis zur Trockene eingeengt. Den Rückstand behandelt man mit Ethanol und gibt Ether zu bis zur leichten Trübung. Im Kühlschrank kristallisiert das Produkt als weißes Pulver aus.

Ausbeute: 11.7 g (88 %)

Fp.: 175-177°C

Rf_A: 0.60, Rf_D: 0.17

$C_{12}H_{14}N_2O_5$ (266.253) Ber: C 54.13 H 5.30 N 10.52

Gef: C 53.78 H 5.05 N 10.11

Leucinbenzylester.Hydrochlorid (L-Leu-OBzl.HCl)

Zu 34.8 g (0.22 Mol) Benzolsulfonsäure, gelöst in 100 ml warmem Benzylalkohol gibt man 26.2 g (0.2 Mol) L-Leucin und erhitzt 3 Stunden bei 130°C. Nachdem der Benzylalkohol abdestilliert wurde, erhält man ein rohes Produkt von Leucinbenzylester -Benzolsulfonat. Dieses löst in man in 200 ml Chloroform und 26.6 ml (0.19 Mol) Triethylamin und rührt kräftig 15 Minuten lang unter Eiskühlung. Dazu gibt man 400 ml wasserfreien Ether und filtriert das ausgefallene Triethylammoniumbenzoesäuresulfonat ab. Die überstehende Lösung wird mit trockenem HCl-Gas gesättigt und im Vakuum zur Trockene eingedampft. Den Rückstand löst man in 25 ml heißem Chloroform und gibt 350 ml Cyclohexan zu. Im Kühlschrank kristallisiert das Produkt nach 2 Tagen aus. Den Niederschlag saugt man ab und wäscht mit Cyclohexan nach und trocknet im Vakuum.

Ausbeute: 36.6 g (71 %)

Fp.: 126-128°C, Lit. 129°C [121]

Rf_A: 0.52, Rf_D: 0.38

$[\alpha]_D^{25}$: -8.5° (c=2,1N HCl), Lit. $[\alpha]_D^{25}$: -8° (c=2,0.1N HCl) [121]

$C_{13}H_{20}NO_2Cl$ (257.761) Ber: C 60.58 H 7.82 N 5.43 Cl 13.75

Gef: C 60.41 H 7.69 N 5.25 Cl 14.30

N-tert-Butyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-leucinbenzylester (Boc-L-Phe-L-Leu-OBzl)

Die Lösung von 21.2 g (0.08 Mol) Boc-L-Phe-OH und 20.6 g (0.08 Mol) H-L-Leu-OBzl.HCl, sowie 10.8 g (0.08 Mol)

HOBt und 8.78 ml (0.08 Mol(N-Methylmorpholin in 400 ml Dimethylformamid kühlt man auf -15°C ab. Dazu tropft man 16.5 g (0.08 Mol) DCC, gelöst in 100 ml Dimethylformamid und gekühlt auf -15°C. Man läßt langsam auf Raumtemperatur kommen und rührt dann noch 12 Stunden. Nach Absaugen des Dicyclohexylharnstoffs engt man das Filtrat ein. Das viskose Öl wird in Essigester aufgenommen, dreimal mit 5%iger $NaHCO_3$-Lösung, 10%iger Citronensäurelösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird mit Essigester bis zur leichten Trübung versetzt. Im Kühlschrank kristallisiert das Produkt aus.

Ausbeute: 30 g (80 %)

Fp.: 89-93°C

Rf_A: 0.78, Rf_D: 0.72

$[\alpha]_D^{20}$: -23.2° (c=1.06, MeOH)

$C_{27}H_{36}N_2O_5$ (468.594) Ber: C 69.20 H 7.74 N 5.97

Gef: C 68.82 H 7.87 N 6.18

Phenylalanyl-L-leucinbenzylester.Hydrochlorid (H-L-Phe-L-Leu-OBzl.HCl)

20 g (42.7 mMol) Boc-L-Phe-L-Leu-OBzl werden bei Raumtemperatur mit 100 ml 1.2N HCl/Eisessig (120 mMol) übergossen und 30 Minuten lang gerührt. Danach entfernt man das Abspaltungsreagenz am Rotationsverdampfer, extrahiert noch dreimal mit Methanol nach. Das Produkt kristallisiert aus Methanol unter Zugabe von Ether.

Ausbeute: 15.9 g (90 %)

Fp.: 160-162°C, Lit. 159-160°C [122]

Rf_A: 0.66, Rf_D: 0.62

$[\alpha]_D^{20}$: -20.3° (c=1.03, MeOH)

$C_{22}H_{29}N_2O_3Cl$ (407.938) Ber: C 64.77 H 6.91 N 6.86 Cl 8.69

Gef: C 65.31 H 7.35 N 6.99 Cl 8.76

N-Benzyloxycarbonyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucinbenzylester (Z-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBzl)

Die Lösung von 11.3 g (42.7 mMol) Z-Gly-Gly-OH und 15.1 g (37 mMol) H-L-Phe-L-Leu-O-Bzl.HCl in 300 ml DMF kühlt man auf -10°C ab. Dann fügt man bei dieser Temperatur nacheinander 5.8 g (42.7 mMol) N-Hydroxybenzotriazol, 4.06 ml (37 mMol) N-Methylmorpholin und 8.7 g (43 mMol) DCC, gelöst in kaltem DMF, dazu. Nach zwanzigstündiger Reaktionszeit wird wie üblich aufgearbeitet. Das Produkt kristallisiert aus Essigester unter Zugabe von Petrolether.

Ausbeute: 14.8 g (64.9 %)

Fp.: 154-155°C

Rf_A: 0.73, Rf_D: 0.61

$[\alpha]_D^{20}$: -11° (c=1.0, DMF)

$C_{34}H_{40}N_4O_7$ (616.715) Ber: C 66.21 H 6.53 N 9.08

Gef: C 65.98 H 5.92 N 9.21

Glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin.Hydrochlorid (H-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH.HCl)

12.3 g (0.02 Mol) des beidseitig geschützten Tetrapep-

tids Z-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OBzl werden in 120 ml Methanol gelöst, einige Tropfen Wasser zugegeben, dann wird hydriert. Als Katalysator wird 1.5 g 10% Pd auf Aktivkohle verwendet. Bei der Reaktion wird die freiwerdende Aminogruppe mit verdünnter Salzsäure abgefangen. Nach 3 Stunden wird abgebrochen, vom Katalysator abfiltriert und eingeengt. Nach mehrwöchigem Stehen kristallisiert das Tetrapeptidhydrochlorid aus der konzentrierten methanolischen Lösung aus (physikal.Daten vergl.auch S. 125).

Ausbeute: 7.0 g (82 %)

Fp.: 210-215°C

Rf_A: 0.44, Rf_D: 0.13

$[\alpha]_D^{20}$: -6.5° (c=1.o, MeOH)

$C_{19}H_{29}N_4O_5$ Cl (428.917) Ber: C 53.20 H 6.81 N 13.06 Cl 8.27

Gef: C 52.10 H 6.81 N 12.74 Cl 8.21

N-Benzyloxycarbonyl-L-tyrosin-N-hydroxysuccinimidester (Z-L-Tyr-OSu)

In 50 ml DMF löst man 12 g (38 mMol) Z-L-Tyr-OH und 4.37 g (38 mMol) N-Hydroxysuccinimid. Die Reaktionsmischung kühlt man sodann auf 0°C ab und tropft dazu 7.8 g (38 mMol) DCC, gelöst in 50 ml Essigester. Nach Stehenlassen über Nacht im Kühlschrank saugt man anderntags vom ausgefallenen Harnstoff ab. Das Filtrat wird eingeengt und der Aktivester aus Essigester auskristallisiert.

Ausbeute: 11 g (70.15 %)

Fp.: 109-111°C

Rf_A: 0.79, Rf_D: 0.79

$[\alpha]_D^{20}$: -31.3 (c=1.08, DMF)

$C_{21}H_{20}N_2O_7$ (412.398) Ber: C 61.16 H 4.88 N 6.79

Gef: C 61.86 H 5.23 N 6.69

N-Benzyloxycarbonyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Z-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

Zur Lösung von 4.3 g (10 mMol) H-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH. HCl und 2.78 ml (20 mMol) Triethylamin in 30 ml DMF tropft man die Lösung von 4.12 g (10 mMol) Z-L-Tyr-OSu in 25 ml DMF. Man rührt bei Raumtemperatur noch 20 Stunden, zieht dann das gesamte Lösungsmittel ab, nimmt den Rückstand in Essigester/Phosphorsäurepuffer (pH 3) auf, trennt die organische Phase ab, extrahiert die Wasserphase nochmals mit Essigester und wäscht dann die vereinigten organischen Extrakte mit gesättigter Kochsalzlösung. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird mit Ether/Petrolether gefällt.

Ausbeute: 5.2 g (75.3 %)

Fp.: 120-135°C

Rf_A: 0.74, Rf_D: 0.32

$[\alpha]_D^{20}$: -8.95° (c=1.06, MeOH)

$C_{36}H_{44}N_5O_9$ (690.774) Ber: C 62.60 H 6.42 N 10.14

Gef: C 62.87 H 6.38 N 10.06

L-Tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) (Leucin-Enkephalin)

1.38 g (2 mMol) des geschützten Pentapeptids löst man in 70 ml DMF. Dazu gibt man 0.42 ml (2 mMol) 4.75 N HCl in Dioxan und 200 mg Pd/Aktivkohle. Man hydriert das Reaktionsgemisch 90 Minuten lang. Danach ist dünnschichtchromatographisch kein geschütztes Pentapeptid mehr nachzuweisen. Man filtriert von der Aktivkohle ab und engt bis zur Trockene ein. Der Rückstand wird in 50 ml 4.75 N HCl/Dioxan aufgenommen und eine Stunde gerührt. Danach wird wieder bis zur Trockene eingeengt, dreimal mit Ether übergossen, kurz verrührt und der Ether dekantiert. Als Rückstand bleibt eine weiße amorphe Masse, die in wenig Methanol aufgenommen und über Kieselgel 60 gereinigt wurde. Die gesammelten Fraktionen werden vereinigt, bis zur Trockene eingeengt, in Wasser aufgenommen und lyophilisiert.

Ausbeute: 685 mg (57.8 %)

Fp.: 178-195°C

Rf_A: 0.58, Rf_D: 0.20

$[\alpha]_D^{26}$: +26.9° (c=1.0, MeOH)

$C_{28}H_{40}N_5O_8Cl$ (610.108) Ber: C 55.12 H 6.60 N 11.47 Cl 5.80

Gef: C 54.79 H 6.39 N 11.01 Cl 6.03

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESE-SCHEMA 8 (s.S. 47)

N-Benzyloxycarbonyl-ß-alanin (Z-ß-Ala-OH)

Zu einer Lösung von 89.1 g (1 Mol) ß-Alanin in 250 ml 4N (1 Mol) Natronlauge gibt man portionsweise 190 g (1.1 Mol) Benzyloxycarbonylchlorid zu. Man läßt noch weitere 4 Stunden reagieren, stellt mit 3N Salzsäure den pH auf 3. Man überschichtet die wäßrige Lösung mit derselben Menge Essigester und rührt 30 Minuten unter Eiskühlung. Die organische Phase wird abgetrennt, die Wasserphase noch dreimal mit Essigester extrahiert und die vereinigten organischen Phasen neutral gewaschen. Nach Trocknen über Natriumsulfat wird auf die Hälfte des Volumens eingeengt und mit Petrolether das Produkt gefällt.

Ausbeute: 85 %

Fp.: 104°C

Rf_A: 0.53, Rf_D: 0.50

$C_{11}H_{13}NO_4$ (223.228) Ber: C 59.18 H 5.87 N 6.27

Gef: C 59.58 H 6.07 N 6.50

N-Benzyloxycarbonyl-ß-alanyl-glycinethylester (Z-ß-Ala-Gly-OEt)

Die Lösung von 22.3 g (0.1 Mol) Z-ß-Ala-OH und 13.9 g (0.1 Mol) H-Gly-OEt.HCl in 300 ml DMF wird nacheinander mit 11 ml (0.1 Mol) N-Methylmorpholin und 13.5 g 1-Hydroxybenzotriazol versetzt. Dann kühlt man auf -10° ab und gibt 20.6 g (0.1 Mol) vorgekühltes und in

DMF gelöstes Dicyclohexylcarbodiimid auf einmal zu. Nach einstündiger Reaktionszeit bei -10°C erwärmt man auf Zimmertemperatur. Nach zwölfstündiger Kupplungsdauer saugt man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engt ein, nimmt den Rückstand in Essigester auf und wäscht dreimal mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 2N Citronensäure und anschließend mit Wasser, bis das Waschwasser neutrale Reaktion zeigt. Nach Trocknen und Einengen wird mit Petrolether gefällt.

Ausbeute: 27.7 g (90 %)

Fp.: 104-106°C

Rf_A: 0.72, Rf_D: 0.60

$C_{15}H_{20}N_2O_5$ (308.334) Ber: C 58.43 H 6.53 N 9.08

Gef: C 58.16 H 6.78 N 8.99

N-Benzyloxycarbonyl-ß-alanyl-glycin (Z-ß-Ala-Gly-OH)

15.4 g (50 mMol) des geschützten Dipeptids werden mit 50 ml (50 mMol) 1N Natronlauge in 200 ml Methanol unter Dünnschichtkontrolle verseift. Nach beendeter Reaktionszeit neutralisiert man mit 50 ml (50 mMol) 1N Salzsäure , engt auf etwa 1/4 des ursprünglichen Volumens ein und ersetzt die abdestillierte Flüssigkeitsmenge durch Wasser. Die Wasserphase wird nun mehrere Male mit Essigester extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte werden neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Auf Zugabe von Petrolether fällt das Dipeptid kristallin an.

Ausbeute: 12.6 g (89.5 %)

Fp.: 206-208°C

Rf_A: 0.61, Rf_D: 0.23

$C_{13}H_{16}N_2O_5$ (280.280) Ber: C 55.70 H 5.75 N 9.99

Gef: C 55.38 H 5.74 N 9.70

N-Benzyloxycarbonyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanin-methylester (Z-ß-Ala-Gly-L-Phe-OMe)

11.2 g (40 mMol) Z-ß-Ala-Gly-OH und 8.6 g (40 mMol) L-Phe-OMe.HCl werden mit 4.4 ml (40 mMol) N-Methylmorpholin, 5.4 g (40 mMol) HOBt und 8.24 g (40 mMol) DCC in DMF gekuppelt. Nach Reaktion über Nacht wird der Harnstoff abfiltriert,mit kaltem DMF nachgewaschen und das Filtrat bei 40°C Badtemperatur eingeengt. Das zurückbleibende Öl nimmt man in Essigester auf, wäscht mit dreimal 100 ml gesättigter Natronhydrogencarbonatlösung,2N Citronensäurelösung und Wasser.Nach Trocknen über Natriumsulfat wird die Essigesterphase auf die Hälfte eingeengt und mit Petrolether gefällt. Im Kühlschrank erhält man nach einigen Tagen weiße Kristalle. Das Produkt wird abgesaugt und mit eiskaltem Petrolether nachgewaschen.

Ausbeute: 11.9 g (67.5 %)

Fp.: 131°C

Rf_A: 0.73, Rf_D: 0.71

$[\alpha]_D^{20}$: +35° (c=1.0, MeOH)

$C_{23}H_{27}N_3O_6$ (441.484) Ber: C 61.81 H 5.89 N 9.83

Gef: C 60.93 H 5.80 N 9.67

N-Benzyloxycarbonyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucinmethylester (Z-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe)

Man löst 4.27 g (10 mMol) Z-ß-Ala-Gly-L-Phe-OH und 1.8 g (10 mMol) L-Leu-OMe.HCl in 120 ml DMF und kuppelt mittels DCC (2.06 g = 10 mMol), 1-Hydroxybenzotriazol (1.35 g = 10 mMol) und 1N -Methylmorpholin (1.1 ml = 10 mMol). Nach 15stündiger Reaktionszeit saugt man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engt ein, nimmt in Essigester auf und wäscht sauer, basisch und neutral. Nach Trocknen der Essigesterphase wird mit Ether/Petrolether bis zur leichten Trübung versetzt. Den erhaltenen Niederschlag saugt man ab und wäscht mit kaltem Petrolether nach.

Ausbeute: 4 g (72.72 %)

Fp.:112-118°C (Sintern)

Rf_A: 0.80, Rf_D: 0.63

$[\alpha]_D^{20}$: -28.7° (c=1.0, MeOH)

$C_{29}H_{38}N_4O_7$ (554.644) Ber: C 62.80 H 6.90 N 10.10

Gef: C 63.07 H 6.71 N 10.27

ß-Alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucinmethylester. Hydrochlorid (ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe.HCl)

Die methanolische Lösung von 2.77 g (5 mMol) wird mit einigen Tropfen Wasser versetzt. Dazu gibt man 300 mg Pd/Aktivkohle und hydriert innerhalb 45 Minuten die Carbo-

benzoxy-Gruppe ab. Der pH-Wert wird dabei immer konstant bei 4 gehalten. Die Reaktionslösung engt man bis zur Trockene ein, übergießt den Rückstand dreimal mit Ether und dekantiert ab. Dann löst man ihn bei 40°C in Essigester auf und fällt das Tetrapeptidhydrochlorid mit Ether aus.

Ausbeute: 1.72 g (75.4 %)

Fp.: 179-183°C

Rf_A: 0.34, Rf_D: 0.26

$[\alpha]_D^{20}$: -20.2° (c=1.0,DMF)

$C_{21}H_{33}N_5O_4Cl$ (456.971) Ber: C 55.19 H 7.27 N 12.26 Cl 7.75

Gef: C 54.39 H 7.91 N 11.64 Cl 8.84

Aminosäurenanalyse:

	Phe	Leu	Gly	ß-Ala
Ber:	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef:	1.0	1.0	0.88	0.92

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe)

1.37 g (3 mMol) des Tetrapeptids ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe.HCl, löst man in 80 ml DMF und gibt dazu 405mg (3 mMol) HOBt, 0.33 ml (3 mMol) N-Methylmorpholin, 618 mg (3 mMol) DCC und 843 mg (3 mMol) Boc-L-Tyr-OH. Nach zwölfstündigem Rühren bei Raumtemperatur wird vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff abgesaugt, mit wenig kaltem DMF nachgewaschen und das Filtrat eingeengt. Das zurückbleibende Öl nimmt man in Essigester auf, wäscht mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 2N Citronen-

säurelösung und Wasser. Anschließend trocknet man über Natriumsulfat. Nach Einengen kristallisiert das Produkt auf Zugabe von Ether /Petrolether im Verhältnis 1:1. Es wird abgesaugt und mit Petrolether nachgewaschen. Umkristallisiert wird aus der gleichen Lösungsmittelkombination.

Ausbeute: 1.6 (78.3 %)

Fp.: 103-107°C

Rf_A: 0.38, Rf_D: 0.62

$[\alpha]_D^{20}$: -7.4° (c=0.95, MeOH)

$C_{35}H_{49}N_5O_9$ (683.803) Ber: C 61.47 H 7.22 N 10.24

Gef: C 60.76 H 7.74 N 9.76

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

1.36 g (2 mMol) des obigen geschützten Dipeptids werden mit 2 ml 1N Natronlauge in methanolischer Lösung verseift. Nachdem im Dünnschichtchromatogramm kein Ausgangsprodukt mehr festzustellen ist, wird mit 1N Salzsäure der pH-Wert 4 eingestellt. Am Rotationsverdampfer engt man bis zur Trockene ein. Ein dünnschichtchromatographisch sauberes Produkt, das jedoch nicht kristallin zu erhalten ist, wird ohne weitere Charakterisierung für die nachfolgenden Reaktionen verwendet.

L-Tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) ([ß-Ala]^2-Leucin-Enkephalin)

Unter Stickstoffatmosphäre übergießt man 1.6 g (2.3 mMol)

des als Öl erhaltenen N-terminal geschützten Pentapeptids mit 50 ml (600 mMol) eiskalter konzentrierter Salzsäure (12N,p.a.). Nach 8 Minuten wird die Salzsäure am Rotationsverdampfer bei 5°C Badtemperatur abgezogen. Der Rückstand wird in Wasser aufgenommen und wieder eingeengt, um letzte Salzsäurespuren zu entfernen. Danach lyophilisiert man das Produkt. Nach chromatographischer Reinigung auf einer Kieselgel 60 Säule mit Methanol/Benzol/Chloroform/Wasser (40:40:40:5) als Elutionsmittel erhält man [ß-Ala]^2-Leucin-Enkephalin in reiner Form.

Ausbeute: 691 mg (48.2 %)

Fp.: 162°C Sintern, ab 200-204°C Zersetzung

Rf_A: 0.53, Rf_D: 0.28

$[\alpha]_D^{20}$: +6.87° (c=0.99, MeOH)

$C_{29}H_{42}N_5O_8Cl$ (624.135) Ber: C 55.80 H 6.78 N 11.22 Cl 5.68

Gef: C 56.28 H 6.54 N 10.69 Cl 4.78

Aminosäurenanalyse:	Gly	Leu	Phe	Tyr	ß-Ala
Ber:	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Gef:	1.0	0.92	0.99	0.76	0.99

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESESCHEMA 9 (s.S. 51)

N-Benzyloxycarbonyl-ß-alanyl-glycinmethylester (Z-ß-Ala-Gly-OMe)

Die Lösung von 22.3 g (0.1 Mol) Z-ß-Ala-OH und 12.5 g (0.1 Mol) H-Gly-OMe.HCl in 300 ml DMF wird nacheinander

mit 11 ml (0.1 Mol) N-Methylmorpholin und 13.5 g 1-Hydroxybenzotriazol versetzt. Dann kühlt man auf -10° C ab und gibt 20.6 g (0.1 Mol) vorgekühltes und in DMF gelöstes Dicyclohexylcarbodiimid auf einmal zu. Nach einstündiger Reaktionszeit bei -10°C erwärmt man auf Zimmertemperatur. Nach zwölfstündiger Kupplungsdauer saugt man vom ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, engt ein, nimmt den Rückstand in Essigester auf und wäscht mit gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung (3 mal jeweils 100 ml), 2N Citronensäurelösung (3 mal jeweils 100 ml) und mit Wasser, bis das Waschwasser neutrale Reaktion zeigt. Nach Trocknen und Einengen wird mit Petrolether gefällt.

Ausbeute: 26.8 g (91 %)

Fp.: 102-103°C

Rf_A: 0.63, Rf_D: 0.52

$C_{14}H_{18}N_2O_5$ (294.307) Ber: C 57.13 H 6.16 N 9.51

Gef: C 58.24 H 6.45 N 9.71

ß-Alanyl-glycylmethylester.Hydrochlorid (ß-Ala-Gly-OMe. HCl)

15.4 g (50 mMol) z-ß-Ala-Gly-OMe werden in 200 ml Methanol gelöst. Dazu gibt man 2 g 10%ige Palladium auf Aktivkohle undhydriert mit Wasserstoff (reinst). Mit einer 5N HCl/Dioxanlösung wird der pH-Wert während der Hydrierung konstant bei 4.5 gehalten. Nach ca.30 Minuten ist die Reaktion beendet. Der Katalysator wird abfiltriert, das Filtrat eingeengt. Durch Zugabe

von Ether wird der Dipeptidester ausgefällt.

Ausbeute: 9.3 g (94.6 %)

Fp.: 119-111°C

Rf_A: 0.23, Rf_D: 0.14

$C_6H_{13}N_2O_3Cl$ (196.634) Ber: C 36.94 H 6.66 N 14.24 Cl 18.03

Gef: C 37.88 H 6.73 N 13.28 Cl 16.56

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-methylester (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-OMe)

5.6 g (20 mMol) Boc-L-Tyr-OH und 4.2 g (20mMol) ß-Ala-Gly-OMe.HCl werden in 150 ml absolutem DMF gelöst. Dazu gibt man nacheinander 2.7 g (20 mMol) HOBt, 4.12 g (20 mMol) DCC und 2.2 ml (20 mMol) N-Methylmorpholin. Nach zwölfstündiger Reaktionszeit filtriert man den ausgefallenen Dicyclohexylharnstoff ab, wäscht ihn mit wenig DMF nach und engt das Filtrat ein. Das gelbliche Öl wird in Essigester aufgenommen, mit Natriumhydrogencarbonatlösung, Citronensäurelösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen mit Natriumsulfat kann das Tripeptid aus Essigester/Ether/Petrolether gefällt werden.

Ausbeute: 5.8 g (69 %)

Fp.: 122-124°C

Rf_A : 0.65, Rf_D: 0.48

$[\alpha]_D^{20}$: +6.5° (c=1, MeOH)

$C_{20}H_{29}N_3O_7$ (423.466) Ber:C 56.73 H 6.90 N 9.92

Gef:C 56.73 H 7.07 N 9.91

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycin (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-OH)

Man löst 8.5 g (20 mMol) des Tripeptidmethylesters Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-OMe in 100 ml Methanol und versetzt bei Raumtemperatur mit 20 ml (20 mMol) 1N Natronlauge. Nach einer Stunde engt man auf etwa 1/4 des Volumens ein und versetzt dann mit der zehnfachen Menge Wasser. Die Wasserphase wird zweimal mit Ether extrahiert, mit verdünnter Phosphorsäure auf pH 3 gebracht und fünfmal mit je 70 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte werden mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Einengen und Zugabe von Petrolether erhält man das Produkt als fein kristallinen Niederschlag.

Ausbeute: 5.7 g (70 %)

Fp.: 129-132°C

Rf_A: 0.60, Rf_D: 0.12

$[\alpha]_D^{23}$: +9.1 (c=1.01, MeOH)

$C_{19}H_{27}N_3O_7$ (409.439) Ber: C 55.74 H 6.65 N 10.26

Gef: C 55.32 H 6.75 N 9.89

Aminosäurenanalyse:

	Gly	Tyr	ß-Ala
Ber:	1.0	1.0	1.0
Gef:	1.0	0.7	1.0

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanylmethylester (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-OMe)

Man löst 4.1 g (10 mMol) des obigen Tripeptids in 150 ml DMF und gibt dazu nacheinander 2.15 g (10 mMol) L-Phe-OMe.HCl, 1.1 ml (10 mMol) N-Methylmorpholin und 1.35 g (10 mMol) HOBt. Dann kühlt man auf -15°C ab und tropft die Lösung von 2.06 g (10 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid in DMF zu. Bei dieser Temperatur wird noch eine Stunde gerührt und weitere 12 Stunden bei Raumtemperatur. Der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff wird abgesaugt, mit kaltem DMF nachgewaschen und das Filtrat am Rotationsverdampfer eingeengt. Danach wird in Essigester aufgenommen und dreimal alkalisch gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und auf die Hälfte des Volumens eingeengt. Ausgefällt wird das Produkt mit Petrolether. Nach zweimaligem Umfällen aus der gleichen Lösungsmittelkombination erhält man die Substanz kristallin.

Ausbeute: 4.8 g (84.1 %)

Fp.: 190-194°C

Rf_A: 0.69, Rf_D: 0.47

$[\alpha]_D^{20}$: +16.6 (c=1.01, MeOH)

$C_{29}H_{38}N_4O_8$ (570.643) Ber: C 61.04 H 6.71 N 9.82

Gef: C 61.65 H 6.59 N 9.77

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanin (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-OH)

Man verseift 1.7 g (3 mMol) Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-OMe mit 3 ml 1N Natronlauge in 50 ml Methanol.

Nach 2 Stunden gibt man weitere 2 ml Natronlauge dazu. Nach Reaktionsende neutralisiert man mit der gleichen Menge 1N Salzsäure und engt auf etwa 1/10 des Volumens ein. Dann nimmt man in 150 ml Wasser auf und extrahiert mit Essigester. Nach Trocknen über Natriumsulfat und Einengen fällt das Produkt bereits aus Essigester kristallin an. Die Fällung wird mit Petrolether vervollständigt.

Ausbeute: 1.3 g (78 %)

Fp.: 160-165°C

Rf_A: 0.64, Rf_D: 0.24

$[\alpha]_D^{20}$: +30.3° (c=0.997, MeOH)

$C_{28}H_{36}N_4O_8$ (556.616) Ber: C 60.42 H 6.52 N 10.07

Gef: C 60.30 H 6.60 N 10.62

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucinmethylester (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OMe)

Man löst das Tetrapeptid Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-OH (1.1 g, 2 mMol) und 0.37 g (2 mMol) L-Leu-OMe.HCl in 50 ml Dimethylformamid. Man kühlt auf -10°C ab und gibt nacheinander 0.22 ml (2 mMol) N-Ethylmorpholin, 0.27 g (2 mMol) 1-Hydroxybenzotriazol und 0.41 g (2 mMol) Dicyclohexylcarbodiimid zu.Nach zwölfstündiger Reaktionszeit wird der ausgefallene Dicyclohexylharnstoff abfiltriert, mit wenig kaltem DMF nachgewaschen und die vereinigten Filtrate eingeengt. Den Rückstand nimmt man in 30 ml Essigester auf, wäscht mit Natriumhydrogencar-

bonatlösung, 2N Citronensäurelösung und Wasser. Nach Trocknen mit Natriumsulfat und Versetzen mit Petrolether kristallisiert das Produkt aus.

Ausbeute: 901 mg (66.3 %)

Fp.: 103-105°C

Rf_A: 0.82, Rf_D: 0.62

$[\alpha]_D^{20}$: -7.3° (c=1.04, MeOH)

$C_{35}H_{49}N_5O_9$ (683.803) Ber: C 61.47 H 7.22 N 10.24

Gef: C 60.91 H 7.04 N 9.88

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

Das obige Pentapeptid 683 mg (1 mMol) wird in 40 ml Methanol gelöst und mit 1 ml (1 mMol) 4N Natronlauge verseift. Nach 4 Stunden neutralisiert man mit der äquivalenten Menge (1 ml) 1N Salzsäure. Danach wird die Reaktionsmischung bis zur Trockene eingeengt, in Wasser aufgenommen und mit Essigester extrahiert. Nach zweimaligem Waschen mit gesättigter Kochsalzlösung trocknet man die organische Phase über Natriumsulfat, engt etwa auf die Hälfte ein und gibt Petrolether dazu. Nach drei bis vier Tagen scheidet sich eine zähe klebrige Masse ab, die dann im Hochvakuum erstarrt.

Ausbeute: 428 mg (63.5 %)

Fp.: 145-151°C

Rf_A: 0.69, Rf_D: 0.39

$[\alpha]_{546}^{20}$: +1.3° (c=0.975, MeOH)

$C_{35}H_{49}N_5O_9$ (669.776 Ber: C 60.97 H 7.07 N 10.46

Gef: C 61.09 H 7.54 N 10.42

L-Tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) ([ß-Ala]^2-Leucin-Enkephalin)

340 mg (1 mMol) Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OH werden bei Raumtemperatur mit 10 ml HCl/Eisessig übergossen und 30 Minuten lang gerührt. Danach wird das Reagenz am Rotationsverdampfer abgezogen, mehrere Male mit Methanol nachextrahiert. Beim Einengen bleibt ein fester, leicht gelber Rückstand. Dieser wird in Wasser aufgenommen, von unlöslichen Begleitstoffen abfiltriert und lyophilisiert. Das gefriergetrocknete Produkt reinigt man über Kieselgel 60 mit Methanol/Benzol/Chloroform/Wasser (40:40:40:5). Das erhaltene Produkt wird mit HPLC auf Reinheit geprüft.

Ausbeute: 280 mg (46.2 %)

Fp.: ab 169°C Sintern, 199-203°C Schmelzen unter Zersetzung

Rf_A: 0.52, Rf_D: 0.20

$[\alpha]_D^{20}$: +6.5 (c=1.04, MeOH)

$C_{29}H_{41}N_5O_8 \cdot 1/2\ HCl$ (605.904) Ber: C 57.48 H 6.90 N 11.55 Cl 2
Gef: C 57.33 H 6.65 N 11.11 Cl 2

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESESCHEMA 10 (s.S. 54)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycinhydrazid (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-N_2H_3)

2.10 g (5 mMol) Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-OMe löst man in möglichst wenig Methanol und fügt bei Raumtemperatur 1.5 g

(30 mMol) Hydrazinhydrat hinzu. Nach zweitägigem Stehen bei Raumtemperatur beginnt das Hydrazid zu kristallisieren. Die Fällung wird über Nacht im Kühlschrank vervollständigt. Man saugt das Produkt ab und wäscht mit Pentan nach.

Ausbeute: 1,74 g (82.5 %)

Fp.: 178-180°C

Rf_A: 0.42, Rf_D: 0.31

$[\alpha]_D^{23}$: +12.4° (c=0.996, MeOH)

$C_{19}H_{29}N_5O_6$ (423.470) Ber: C 53.89 H 6.90 N 16.53

GEf: C 53.78 H 7.24 N 16.38

N-tert.-Butyloxycarbonyl-L-tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-phenylalanin -L-methionin-tert.-butylester (Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Leu-OBu^t)

1.27 g (3 mMol) des Boc-L-Tyr-ß-Ala-Gly-N_2H_3 werden in 30 ml DMF gelöst und bei -35°C mit 0.44 ml (3.3 mMol) Isoamylnitrit und 3.3 ml (6 mMol) 1.8N HCl/THF versetzt. Nach einer halben Stunde wird mit 0.83 ml (6 mMol) TEA neutralisiert und danach werden 1.05 g (3 mMol) L-Phe-L-Met-OBu^t zugegeben. Man rührt nun eine weitere Stunde bei -25°C und läßt 12 Stunden bei 0°C und zwei Tage bei Raumtemperatur stehen. Die Reaktionsmischung engt man am Rotationsverdampfer ein, verteilt den öligen Rückstand zwischen Wasser und Essigester. Die Essigesterphase wird nun rasch mit Hydrogencarbonatlösung gewaschen und getrocknet. Durch vorsichtige Zugabe von wenig

Ether kann das Pentapeptid zur Kristallisation gebracht werden.

Ausbeute: 1.8 g (82.3 %)

Fp.: 100-107°C

Rf_A: 0.78, Rf_D: 0.61

$[\alpha]_D^{20}$: +3.2 (c=0.94, MeOH)

$C_{37}H_{53}N_5O_9S$ (743.921) Ber: C 59.73 H 7.18 N 9.41 S 4.31

Gef: C 60.39 H 7.44 N 8.89 S 4.34

L-Tyrosyl-ß-alanyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-methionin (H-L-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Met-OH) ($[ß\text{-Ala}]^2$-Met-Enkephalin)

743.9 mg (1 mMol) Boc-Tyr-ß-Ala-Gly-L-Phe-L-Met-OBu^t werden mit 20 ml eines Gemisches von TFA/Methylenchlorid (1:1, v/v) bei Raumtemperatur übergossen. Nach einer Stunde Reaktionszeit engt man am Rotationsverdampfer ein, extrahiert mehrere Male mit Methanol und versetzt im Überschuß mit einer HCl/Dioxanlösung. Danach wird bis zur Trockene eingeengt, in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wird über Sephadex LH 20 mit Methanol gereinigt.

Ausbeute: 120 mg (20.4 %)

Fp.: 165-185°C

Rf_A: 0.63, Rf_D: 0.23

$[\alpha]_D^{20}$: +23.4° (c=0.6, MeOH)

$C_{28}H_{40}N_5O_8SCl$ (mit 1 H_2O und 1 HCl) (642.172)

Ber: C 52.37 H 6.28 N 10.91 S 4.99

Gef: C 51.78 H 5.97 N 9.67 S 4.39

SYNTHESEVORSCHRIFTEN DER VERBINDUNGEN ZUM SYNTHESE-SCHEMA 11 (s.S. 55)

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-methyl-L-tyrosin (Boc-L-Tyr(OMe)-OH)

Boc-L-Tyr-L-Me-OH wird nach Zitat 96 aus H-L-Tyr(OMe)-OH[123] hergestellt.

Ausbeute: 78 %

Fp.: 93-96°C

Rf_A: 0.83, Rf_D: 0.52

$[\alpha]_D^{23}$: +12° (c=0.45, MeOH)

$C_{15}H_{21}NO_5$ (295.335) Ber: C 61.00 H 7.16 N 4.74

Gef: C 60.38 H 7.01 N 5.16

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-methyl-L-tyrosin-N-hydroxy-succinimidester (Boc-L-Tyr(OMe)-OSu)

Boc-L-Tyr-OMe-OSu wird nach Zitat 114 hergestellt.

Ausbeute: 69 %

Fp.: 138-141°C

Rf_A: 0.67, Rf_D: 0.64

$[\alpha]_D^{22}$: -27.6° (c=1.o,DMF)

$C_{19}H_{24}N_2O_7$ (669.776) Ber: C 58.16 H 6.16 N 7.13

Gef: C 58.45 H 6.20 N 6.83

N-tert.-Butyloxycarbonyl-O-methyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (Boc-L-Tyr(OMe)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH)

Man löst 3 g (7 mMol) H-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH.HCl und

1.5 ml (14 mMol) N-Methylmorpholin in 80 ml DMF und tropft dazu 2.7 g (7 mMol) Boc-L-Tyr(OMe)-OSu, gelöst in 30 ml DMF, innerhalb von 10 Minuten. Dann wird das Reaktionsgemisch 24 Stunden auf 0°C gehalten. Anschließend wird das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand zwischen Essigester und verdünnter Phosphorsäure (pH 3) verteilt. Nach Abtrennen der organischen Phase und mehrmaligem Extrahieren der Wasserphase mit Ethylacetat werden die vereinigten organischen Extrakte mit gesättigter Kochsalzlösung neutral gewaschen und mit Natriumsulfat getrocknet. Nachdem etwa auf die Hälfte eingeengt worden ist, gibt man langsam Petrolether zu bis zur leichten Trübung.

Ausbeute: 3.2 g (68.6 %)

Fp.: 139-144°C

Rf_A: 0.72, Rf_D: 0.41

$[\alpha]_D^{20}$: +6.0 (c=1.0, MeOH)

$C_{34}H_{47}N_5O_9$ (669.776) Ber: C 60.97 H 7.07 N 10.46

Gef: C 60.52 H 7.24 N 10.19

O-Methyl-L-tyrosyl-glycyl-glycyl-L-phenylalanyl-L-leucin (H-L-Tyr(OMe)-Gly-Gly-L-Phe-L-Leu-OH) ([Tyr(OMe)]^1-Leucin-Enkephalin)

Unter Stickstoffatmosphäre und Eiskühlung übergießt man 1.5 g (2.24 mMol) des geschützten Pentapeptids mit50 ml (600 mMol) eiskalter konzentrierter Salzsäure. Nach zehnminütiger Reaktionszeit wird die Salzsäure bei 0°C

abgezogen. DerRückstand wird mehrere Male mit Methanol nachextrahiert, in Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet. Dabei fällt das Pentapeptid in reiner Form an.

Ausbeute: 855 mg (61.2 %)

Fp.: 156°C (Sintern) -180°C (Schmelzen)

Rf_A: 0.58, Rf_D: 0.37

$[\alpha]_D^{20}$: +17.3° (c=1.0, MeOH)

$C_{29}H_{42}N_5O_8Cl$ (ber. mit 1 HCl und 1 H_2O)(624.135)

Ber: C 55.81 H 6.78 N 11.22 Cl 5.68

Gef: C 55.27 H 6.62 N 11.00 Cl 5.74

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Synthesewege von Enkephalinen und Enkephalinderivaten werden beschrieben. Die Zwischenverbindungen werden vorwiegend durch ^{13}C-NMR Spektroskopie und Massenspektrometrie charakterisiert.

Nach der zunächst eingeschlagenen Synthesestrategie erhält man zwar Leucin- und Methionin-Enkephalin, jedoch nur in mäßigen Ausbeuten. Sehr unbefriedigend verläuft die alkalische Hydrolyse des Methylesters von Boc-L-Tyr(Bzl)-Gly-Gly-L-Phe-L-Met-OMe. Dabei müssen sehr drastische Bedingungen und lange Reaktionszeiten angewandt werden. Dies führt zwangsläufig zur Bildung von Nebenprodukten. Die Verwendung des tert.-Butylesters als Carboxylschutzgruppe erweist sich als vorteilhaft. Der tert.-Butylester ist leicht acidolytisch abspaltbar. Mit der Entfernung der Boc-Schutzgruppe wird daher auch das Carboxylende deblockiert, wodurch sich die Synthese verkürzt. Im Vergleich zu den alkalisch verseifbaren Alkylestern ist seine Herstellung, zumindest bei einigen Aminosäuren, mit größerem präparativen Aufwand verbunden. In Kombination mit dem tert.-Butylester muß die α-Aminogruppe mit säurestabilen Schutzgruppen blockiert werden. Da bei methioninhaltigen Verbindungen auch nach mehreren Versuchen die Carbobenzoxygruppe nicht abhydriert werden konnte, wird als Aminoschutz der Phthalylrest verwendet. Dieser kann mit Hydrazin in Ethanol problemlos abgespalten werden. Im Rahmen der verschiedenen Enkephalinsynthesen stellte sich heraus,

daß die Hydroxysuccinimidester die besten Ausbeuten liefern. Dabei kann die C-terminale Komponente (Aminosäure oder Peptid) als Natrium oder Triethylammoniumsalz eingesetzt werden. Die dadurch umgangene alkalische Esterhydrolyse, die bei längeren Peptiden stets zu einer Nebenreaktion führt, vereinfacht die Synthese merklich. Zufriedenstellende Ausbeuten liefern auch Azidkupplungen. Die benötigten Hydrazide sind aus den entsprechenden Estern durch Hydrazidolyse herstellbar, kristallisieren gut und eignen sich gleichzeitig zur Reinigung.

Zur Entfernung der Schutzgruppen werden die folgenden Abspaltungsreagenzien verwendet: 1.2N HCl/Eisessig; TFA/Methylenchlorid (v/v); 4.75N HCl/Dioxan; Fluorwasserstoff und konz.Salzsäure. Die schlechtesten Ausbeuten erhält man mit HF. Das Rohprodukt ist ziemlich stark durch Nebenprodukte vereunreinigt. Auch kann eine teilweise Spaltung der Tyr-Gly-Bindung beobachtet werden. Das sauberste Rohenkephalin erhält man bei rascher Abspaltung und Aufarbeitung unter Stickstoff mit eiskalter konzentrierter Salzsäure. Die Möglichkeit, Tyrosin in hydroxylfreier Form einzusetzen, ozne daß bei den einzelnen Reaktionschriften die Bildungvon Nebenprodukten beobachtet wird, ist für die Syntheseplanung von Bedeutung. Man benötigt zur Enkephalinsynthese nur noch leicht sauer abspaltbare Gruppen, während man beim Schutz der phenolischen OH-Gruppe als Benzylester nur mit HF das gewünschte Produkt erhält,

allerdings nur in sehr mäßigen Ausbeuten.

Abschließend ist zu sagen, daß nach den in der vorliegenden Arbeit gemachten Untersuchungen die Synthesestrategie 6 mit den besten Ausbeuten am schnellsten zum Ziele führt.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. C.Schöpf, Justus Liebigs Ann.Chem.452, 211 (1927)

2. M.Gates and G.Tschudi, J.Am.Chem.Soc. 74, 1109 (1952)

3. A.Goldstein, L.J.Lowney,and B.K.Pal, Proc.Natl.Acad. Sci.USA 68, 1742 (1971)

4. C.B.Pert and S.H.Snyder, Science 179, 184 (1973)

5. E.J.Simon, M.M.Hiller, and J.Edelmann, Proc.Natl. Acad.Sci.USA 70, 1947 (1973)

6. L.Terenius, Acta Pharmacol.Toxicol. 33, 377 (1973)

7. S.H.Snyder, Nature 257, 185 (1975)

8. L.Iversen, Nature 258, 567 (1975)

9. W.R.Martin, Pharmacol.Rev.19, 463 (1967)

10. L.Terenius und A.Wahlström, Acta Pharmacol.Toxicol. 35, Suppl.1,55 (1974)

11. G.W.Pasternak, R.Goodman, and S.H.Snyder, Life Sci. 16, 1765 (1975)

12. J.Hughes, Brain Res.88, 295 (1975)

13. L.Terenius und A.Wahlström, Acta Physiol.Scand.94, 74 (1975)

14. J.Hughes, T.W.Smith, H.W.Kosterlitz, L.A.Fothergill, B.A.Morgan, and H.R.Morris, Nature 258, 577 (1975)

15. R.C.A.Frederickson, E.W.Schirmer, E.L.Grinnan,C.E. Harrell, and C.R.Hewes, Life Sci. 19, 1181 (1976)

16. J.Hughes, T.W.Smith, B.Morgan, and L.Fothergill, Life Sci. 16, 1753 (1975)

17. S.H.Snyder, Chem.Eng.News, November 28,26 (1976)

18. R.Simantov and S.H.Snyder, Life Sci.18, 781 (1976)

19. R.Simantov and S.H.Snyder, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 73, 2515 (1976)

20. T.W.Smith, J.Hughes, H.W.Kosterlitz, and R.P.Sosa in H.W.Kosterlitz: "Opiates and Endogenous Opioid Peptides", Seite 57, North-Holland Publishing Company-Amsterdam/New York/Oxford 1976

21. R.M.Kobayashi, M.Palkovits,R.J.Miller,K.J.Chang, and P.Cuatrecasas, Life Sci.22, 527 (1977)

22. T.Höfkelt, Å. Ljungdahl, L.Terenius, R.Elde, and G.Nilson, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74, 3081 (1977)

23. J.H.Poupaert, P.S.Portoghese, and V.Garsky, J.Med. Chem.19, 1354 (1976)

24. H.E.Bleich, J.D.Cutrell, A.R.Day, R.J.Freer, J.A. Glasel, and J.F.McKelvy, Biochem.Biophys.Res.Commun. 71, 168 (1976)

25. H.E.Bleich, J.D.Cutrell, A.R.Day, R.J.Freer, J.A. Glasel, and J.F.McKelvy, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 2589 (1976)

26. H.E.Bleich, A.R.Day, R.F.Freer,and J.A.Glasel, Biochem.Biophys.Res.Commun. 74, 592 (1976)

27. B.P.Roques, C.G.Jaureguiberry, R.Oberlin, M.Anteunis, and A.K.Lala, Nature 262, 778 (1976)

28. C.G.Jaureguiberry, B.P.Roques, R.Oberlin, M.Anteunis, and A.K.Lala, Biochem.Biophys.Res.Commun.71, 558 (1976)

29. C.R.Jones, W.A.Gibbons,and V.Garsky, Nature 262, 779 (1976)

30. M.A.Khaled, M.M.Long, W.D.Thomspon, R.J.Bradley, G.B. Brown, and D.W.Urry, Biochem.Biophys.Res.Commun.76, 224 (1977)

31. S.Combrisson, B.P.Roques, and R.Oberlin, Tetrahedron Lett. 38, 3455 (1976)

32. M.A.Khaled, D.W.Urry, and R.J.Bradley, J.Chem.Soc. Perkin Trans. 2, 1693 (1979)

33. M.Anteunis, A.K.Lala, C.G.Jaureguiberry, and B.P. Roques, Biochemistry 16, 1462 (1977)

34) B.Trancrede, R.Deslauriers, W.H.McGregor, E.Ralston, D.Sarantakis, R.L.Somorijai, and J.C.P.Smith, Biochemistry 17, 2905 (1978)

35. C.G.Jaureguiberry, B.P.Roques, R.Oberlin,M.Anteunis, and S.Combrisson, FEBS Lett. 73, 38 (1977)

36. E.R.Stimson, Y.C.Meinwald, and H.A.Scheraga,Biochemistry 18, 1661 (1979)

37. C.H.Li, L.Barnafi, M.Chrétien, and D.Chung, Nature 208, 1093 (1965)

38. C.H.Li, Nature 201, 924 (1965)

39. L.Gráf and C.H.Li, Biochem.Biophys.Res.Commun.53, 1304 (1973)

40. C.H.Li und D.Chung, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 1145 (1976)

41. C.H.Li and D.Chung, Nature 260, 622 (1976)

42. M.Chrêtien, S.Benjannet, N.Dragon,N.G.Seidah, and M.Lis, Biochem.Biophys.Res.Commun. 72, 472 (1976)

43. C.H.Li, D.Chung, and B.A.Doneen, Biochem.Biophys. Res.Commun.72, 1542 (1976)

44. L.Gráf, E.Barát, G.Cseh, and M.Sajgó, Biochim.Biophys.Acta 229, 276 (1971)

45. R.Guillemin, N.Ling, and R.Burgus, C.R.Acad.Sci. Ser.D 282, 783 (1976)

46. L.H.Lazarus, N.Ling, and R.Guillemin, Proc.Natl. Acad.Sci.USA 73, 2156 (1976)

47. M.Ross, T.Su, B.M.Cox, and A.Goldstein in: H.W. Kosterlitz: "Opiates and Endogenous Opioid Peptides", Seite 35, North-Holland Publishing Company-Amsterdam/New York/Oxford 1976

48. K.Mizuno, N.Minamino, K.Kangawa, and H.Matsuo, Biochem. Biophys.Res.Commun.97, 1283 (1980)

49. S.Kimura, R.V.Lewis, A.S.Stern, J.Rossier,S.Stein, and S.Udenfried, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 1681 (1980)

50. R.V.Lewis, A.S.Stern, S.Kimura, J.Rossier,S.Stein, and S.Udenfried, Science 208, 1459 (1980)

51. A.Cowan, J.C.Doxey, and G.Metcalf in H.W.Kosterlitz: "Opiates and Endogenous Opioid Peptides" Seite 35 North-Holland Publishing Company-Amsterdam/New York/ Oxford 1976

52. J.L.Meek, H.-Y.T.Yang, and E.Costa, Neuropharmacology 16, 151 (1977)

53. J.M.Hambrook, B.A.Morgan, M.J.Rance, and C.F.C.Smith, Nature 262, 782 (1977)

54. C.B.Pert, D.L.Bowie, B.T.W.Fong, and J.-K.Chang in H.W.Kosterlitz: "Opiates and Endogenous Opioid Peptides" Seite 79, North Holland Publishing Company-Amsterdam/New York/Oxford 1976

55. J.R.Miller, J.-K.Chang, P.Cuatrecasas, and S.Wilkinson, Biochem.Biophys.Res.Commun.74, 1311 (1977)

56. J.K.Chang, B.T.W.Fong, and A.Pert, Life Sci.18, 1473 (1976)

57. C.B.Pert, J.K.Chang, and B.T.W.Fong, Science 194, 330 (1976)

58. L.Terenius, A.Wahlström, G.Lindeburg, S.Karlsson, and U.Ragnarsson,Biochem.Biophys.Res.Commun.71, 175 (1976)

59. D.H.Coy, A.J.Kastin, A.V.Schally, O.Morin, N.G.Carvon, F.Labrie, J.M.Walker, R.Fertel, G.G.Berntson, and C.A.Sandman, Biochem.Biophys.Res.Commun.73, 632 (1976)

60. S.Bajusz,A.Z.Rónai, J.I.Székely, Z.D.Kovács, J.Berzétei, and L.Gráf, Acta Biochim.Biophys.Acad.Sci.Hung. 11, 305 (1976)

61. C.R.Beddell, R.B.Clark, G.W.Hardy, L.A.Lowe, F.B. Ubatuba, J.R.Vane, S.Wilkinson, K.J.Chang,P.Cuatrecasas, and R.J.Miller, Proc.R.Soc.London Ser.B 198, 249 (1977)

62. N.S.Agarwal, V.J.Hruby, R.Katz, W.Klee, and M.Nirenberg, Biochem.Biophys.Res.Commun. 76, 129 (1977)

63. D.Roemer, H.H.Buescher, R.C.Hill, J.Pless, W.Bauer, F.Cardinaux, A.Closse, D.Hauser, and R.Huguenin, Nature 268, 547 (1977)

64. N.Ling and R.Guillemin, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 73, 3308 (1976)

65. B.A.Morgan, C.F.C.Smith, A.A.Waterfield, J.Hughes, and H.W.Kosterlitz, J.Pharm.Pharmacol.28, 660 (1976)

66. A.R.Day, M.Lujan, W.L.Dewy, L.S.Harris, J.A.Radding, and J.R.Freer, Res.Commun.Chem.Pathol.Pharmacol.14, 597 (1976)

67. J.Knoll, P.Illés, and K.Medzihradszky, J.Pharm.Pharmacol.30, 394 (1978)

68. R.C.A.Frederickson, R.Nicander, E.L.Smithwick, R. Shuman, and F.H.Norris in H.W.Kosterlitz: "Opiates and Endogenous Opioid Peptides", Seite 239, North Holland Publishing Company-Amsterdam/New York/Oxford 1976

69. H.H.Büscher, R.C.Hill, D.Römer, F.Cardinaux, A.Closse, D.Hauser, and J.Pless, Nature 261, 423 (1976)

70. B.A.Morgan, J.D.Bower, K.P.Guest, B.K.Handa, G.Metcalf, and C.F.C.Smith in M.Goodman and J.Meienhofer: "Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium", Seite 111, John Wiley & Sons, Inc.,New York 1977

71. N.Ling, S.Minick, L.Lazarus, J.Rivier,and R.Guillemin in M.Goodman and J.Meienhofer: "Proceedings of the Fifth American Peptide Symposium", Seite 96, John Wiley & Sons Inc., New Yorkk 1977

72. D.Römer, H.H.Büscher, R.C.Hill, J.Pless, W.Bauer, F.Cardinaux, A.Closse, D.Hauser, and R.Huguenin Nature 268, 547 (1977)

73. A.S.Horn and J.R.Rodgers, Nature 260, 795 (1976)

74. R.Simantov, A.M.Snowman, and S.H.Snyder, Brain Res.107, 650 (1976)

75. H.O.J.Collier and A.C.Roy, Nature 248, 24 (1974)

76. S.K.Sharma, W.A.Klee, and M.Nirenberg,Proc.Natl. Acad.Sci.USA 72, 3092 (1975)

77. E.Bayer, H.Hagenmaier, G.Jung, W.Parr, H.Eckstein, P.Hunziker, and R.E.Sievers, Peptides 1971, 65

78. R.S.Feinberg and R.B.Merrifield, Isr.J.Chem.17, 243 (1978)

79.W.König und R.Geiger, Chem.Ber. 103, 788 (1970)

80. Y.S.Klausner and M.Bodanszky, Synthesis 1972, 453

81. M.Goodman, P.Keogh, and H.Anderson,Bioorg.Chem.6, 239 (1977)

82. J.Honzl und J.Rudinger, Collect.Czech.Chem.Commun. 26, 2333 (1961)

83. K.Medzihradszky und H.Medzihradszky/Schweiger, Acta Chim.Acad.Sci.Hung. 44, 15 (1965)

84. S.Sakakibara, Y.Shimoniski, Y.Kishida, M.Okada, and H.Sugihara, Bull.Chem.Soc.Jpn. 40, 2164 (1967)

85. J.Izdebski, S.Drabarek und M.Lebek, Rocz.Chem.49, 1535 (1975)

86. J.Idzdebski, M.Lebek und S.Drabarek, Rocz.Chem.51, 81 (1977)

87. E.Taschner, J.F.Biernat, B.Rzeszotarska und C. Wasielewski, Justus Liebigs Ann.Chem. 646, 123 (1961)

88. T.Amano, E.Richelson, and M.Nirenberg, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 69, 258 (1972)

89. W.A.Klee and M.Nirenberg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 71, 3474 (1974)

90. B.Hamprecht und J.Schultz, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 354, 1633 (1973)

91. A.Wahlström, M.Brandt, L.Moroder, E.Wünsch, G. Lindeberg, U.Ragnarsson. L.Terenius, and B.Hamprecht, FEBS Lett. 77, 28 (1977)

92. J.Traber. K.Fischer, S.Latzin, and B.Hamprecht (1974) Proc.9th Intern.Congr.Colleg.Int.Neuropsychopharmacologicum, Seite 956-969

93. Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, Firmenschrift der Fa.E.Merck AG., Darmstadt, 1970

94. L.Carpino, C.A.Giza, and B.A.Carpino, J.Am.Chem.Soc. 81, 955 (1957)

95. J.B.Greenstein and M.Winitz: "Chemistry of the Amino Acids", J.Wiley & Sons, Inc., New York 1961

96. E.Schnabel, Justus Liebigs Ann.Chem.702, 188 (1967)

97) H.Eckstein, R.E.Sievers und E.Bayer, Justus Liebigs Ann.Chem. 1973, 1467

98. C.Sorg, E.Rüde und O.Westphal, Justus Liebigs Ann. Chem. 734, 180 (1970)

99. R.Schwyzer, P.Sieber und H.Kappeler, Helv.Chim.Acta 42, 2622 (1959)

100. M.Brenner und R.W.Pfister, Helv.Chim.Acta 34, 2085 (1951)

101) C.Schattenkerk, I.Voskuyl-Holtkamp und R.Bokhorst, Rec.Trav.Chim.Pays-Bas 92, 92 (1973)

102) M.Brenner und W.Huber, Helv.Chim.Acta 36, 1109 (1953)

103) T.Curtius und F.Goebel, J.Prakt.Chem. 37, 150 (1888)

104) H.Schwarz, F.M.Bumpus, and J.H.Page, J.Am.Chem.Soc. 79, 5697 (1957)

105) M.Bergmann und L.Zervas,Chem.Ber. 65, 1192 (1932)

106) A.F.Olechnowitz und G.Zimmermann,Angew.Chem.67, 209 (1955)

107) T.Wieland und B.Heinke, Justus Liebigs Ann.Chem. 599, 70 (1956)

108) S.Guttman und R.A.Boissonnas, Helv.Chim.Acta 41, 1852 (1958)

109) E.Schröder, Justus Liebigs Ann.Chem.688, 250 (1965)

110. J.C.Sheehan, D.W.Chapman and R.W.Roth, J.Am.Chem. Soc. 74, 3822 (1952)

111. R.Roeske, J.Org.Chem. 28, 1251 (1963)

112. O.Studer und W.Lergier, Helv.Chim.Acta 48, 460 (1965)

113. G.W.Anderson, J.E.Zimmermann, and F.M.Callahan, J.Am.Chem.Soc.86, 1839 (1964)

114. E.Wünsch und F.Drees, Chem.Ber.100, 816 (1967)

115. J.D.Bower, K.P.Guest, and B.A.Morgan, J.Chem.Soc. Perkin Trans.1 1976, 2488

116. H.Schwarz and F.M.Bumpus, J.Am.Chem.Soc.81, 890 (1959)

117. E.Schröder, Justus Liebigs Ann.Chem.670, 127 (1963)

118. Y.Wolman, A.Schejter, and M.Sokolovsky, J.Am.Chem. Soc. 94, 1720 (1972)

119. G.Losse, K.D.Wehrstedt, J.Prakt.Chem.320, 963 (1978)

120. E.Berger und H.-D.Jakubke, Pharmazie 34, 349 (1979)

121. H.K.Miller and H.Waelsch, J.Am.Chem.Soc.74, 1092 (1952)

122. A.Cosmatos, J.Photaki und L.Zervas,Chem.Ber.94, 2644 (1961)

123) H.Horn, Diplomarbeit, Universität Tübingen 1974

L E B E N S L A U F

Name, Vorname:	H o r n , Hans
Geburtstag und -ort:	16.12.1945, Unterdigisheim, Zollernalbkreis
Eltern:	Karl Horn und Frieda Horn, geb. Mayer
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Schulbesuch:	
1952-1960	Volksschule Unterdigisheim
1960-1966	Staatl.Aufbaugymnasium Saulgau
17.2.1966	Ablegung der Reifeprüfung
1.10.1966 - 31.3.1968	Ableistung des Grundwehrdienstes
Studium:	
SS 68	Immatrikulation für Chemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Oktober 1970	Abschluß des Vordiploms
Mai 1973	Mündliche Diplomprüfung
Oktober 1973	Diplomarbeit: "Synthesen biologisch aktiver TRH-Derivate
Januar 1976- Dezember 1980 (mit Unterbrechungen)	Praktischer Teil der Doktorarbeit "Synthesewege zu Enkephalinen und Enkephalinderivaten" am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen
Juni 1978 - Januar 1979	Arbeit als Peptidchemiker bei der Fa. Senn - Chemicals, Dielsdorf/Schweiz
August 1979 - Oktober 1980	Wissenschaftl.Angestellter beim Modellversuch Mediendidaktik der Universität Tübingen

Meine akademischen Lehrer waren:

D.Babel, M.Baumann, E.Bayer, W.Braun, E.Breitmaier, G.Greiner, G.Häfelinger, H.Hagenmaier, R.Hamm, M. Hanack, G.Jung, S.Kemmler-Sack, W.A.König, G.Kortüm, W.Kraus, H.Krüger, D.Krug, E.Lindner, J.P.Lorenz, H.Mauser, E.Müller, D.Oelkrug, G.Opitz, H.Pauschmann, G.Pausewang, H.Rau, A.Rieker, W.Rüdorff, W.Rundel, W.Schweizer, F.F.Seelig, H.Stegmann, E.Stumpp, H. Suhr, W.Voelter, K.P.Zeller.